

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Rôle du métabolisme énergétique dans la résistance aux stress au cours du vieillissement des fibroblastes WI-38 en culture

Barez, Aurore

*Award date:*  
1997

*Awarding institution:*  
Université de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

FACULTES UNIVERSITAIRES  
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

**Faculté des Sciences**

**RÔLE DU MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE DANS LA RÉSISTANCE  
AUX STRESS AU COURS DU VIEILLISSEMENT DES  
FIBROBLASTES WI-38 EN CULTURE**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade  
de Licencié en Sciences  
biologiques**

**Aurore BAREZ**

**Juin 1997**

FACULTES  
UNIVERSITAIRES  
N.-D. DE LA PAIX  
NAMUR

Bibliothèque

FMB

4/1997/1

FM B4 / 1997 / 1

FACULTES UNIVERSITAIRES  
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

**Faculté des Sciences**

**RÔLE DU MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE DANS LA RÉSISTANCE  
AUX STRESS AU COURS DU VIEILLISSEMENT DES  
FIBROBLASTES WI-38 EN CULTURE**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade  
de Licencié en Sciences  
biologiques**

Aurore BAREZ

Juin 1997



UBS 7162050  
715837

**Rôle du métabolisme énergétique dans la résistance aux stress au cours du vieillissement des fibroblastes WI-38 en culture**

BAREZ Aurore

Résumé

D'après l'application de la théorie de la thermodynamique des systèmes ouverts loin de l'équilibre, les cellules sont plus sensibles à un stress lorsque leur métabolisme énergétique est abaissé ou lorsque le système de défense mis en place par la cellule pour affronter ce stress, a une intensité déclinée.

Nous avons testé cette hypothèse et montré que des fibroblastes humains en culture sont moins sensibles à des stress oxydatifs (tert-butylhydroperoxyde) ou osmotiques (éthanol) lorsque du D-glucose est ajouté au milieu de stress. Ces cellules connaissent alors une mortalité inférieure et un passage moins élevé vers des étapes ultérieures de leur vieillissement, matérialisé par une diminution du passage des fibroblastes de leurs morphotypes jeunes vers leurs morphotypes âgés.

Les mêmes observations sont réalisées lorsque les fibroblastes subissent un stress oxydatif en présence d'antioxydants, ce qui n'est pas le cas des cellules ayant subi des stress osmotiques. Ces résultats sont donc en faveur de notre hypothèse.

Enfin, nous présentons une mise au point des conditions expérimentales permettant de développer un protocole comparant la consommation d'oxygène de cellules jeunes et vieilles dont la membrane plasmique a été préalablement perméabilisée pour permettre l'accès direct du succinate et de l'ADP aux membranes mitochondriales internes.

Sur la longue et pénible trame de la licence, un grand nombre de personnes m'ont aidée et encouragée. Je tiens donc, par la présente, à les remercier.

Dans un premier temps, pour ses compétences et son accueil dans le laboratoire, je tiens à remercier Monsieur le professeur J. Remacle.

Mes remerciements s'adressent également au spécialiste des stress en tout genre, Olivier Toussaint, pour sa grande disponibilité, sa franchise, sa bonne humeur et sa compétence.

Je tiens également à remercier Andrée Houbion pour ses explications et sa disponibilité, Edouard Delaive pour les coups de pouce et son incroyable gentillesse, Rose Thibault, très patiente lors des prises de photos au microscope et Martine Raes pour sa patience lors des recherches désespérées d'articles.

J'adresse un grand merci à tous les membres du labo, participant à la bonne humeur continuelle y régnant, pour leurs encouragements : Dominique, Maggi, Carine, Dédé, Jean-François, Patsy, Mumu, Isabelle, Sandrine, Martine, Noelle, Catherine, Michet, Marc..., désolé si quelqu'un ne se voit pas repris mais j'ai pensé à lui.

Merci également à Monsieur Faber et à Marie.

Une pensée particulière et tendre à mon papa qui a eu beaucoup de travail, de stress (lui comme les autres) à taper mon mémoire, à ma maman, mes grands-parents et Gilles qui m'ont soutenue moralement et qui partagent les joies, soucis de tous les jours.

Mes remerciements sont également adressés à Monsieur le Professeur F. Sluse (laboratoire de Liège), ainsi qu'au laboratoire de Monsieur Goffinet quant à leur accueil.

# Abréviations .

## Abréviations biochimiques.

ADN =	Acide désoxyribonucléique.
ADP =	Adénosine diphosphate.
ARNm =	Acide ribonucléique messenger.
ARNt =	Acide ribonucléique de transfert.
ATP =	Adénosine triphosphate.
BME =	Milieu basal de Eagle.
BME + SB 10 % =	Milieu basal de Eagle + 10 % de sérum de veau foetal.
CMC =	Concentration micellaire critique.
CPD <sub>s</sub> =	Doublement cumulatif de la population.
CSA =	Cyclosporine A.
DMSO =	Diméthylsulfoxyde.
DO =	Densité optique.
EGTA =	Ethylène glycol - bis - (β - aminoéthyl éther) N,N, N', N' - Tétracetic acid.
GPX =	Glutathion peroxydase.
GSH =	Glutathion.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> =	Peroxyde d'hydrogène.
m - CCP =	Carbonyl cyanide - m - chlorophénylhydrazone.
MF =	Fibroblaste mitotique.
MTT =	Bromure de 3 - (4,5 - diméthylthiazol - yl) - 2,5 - diphényltetrazolium.
NA =	Nicotinamide.
O <sub>2</sub> <sup>(-)</sup> =	Anion superoxyde.
OH· =	Radical hydroxyle.
OH <sup>-</sup> =	Anion hydroxyle.
P =	Production d'entropie.
PBS =	Phosphate buffer saline.
PMF =	Fibroblaste post - mitotique.
RC =	Respiratory control.



ROO <sup>•</sup> =	Radical hydroperoxyde.
ROOH =	Hydroperoxyde.
TBHP =	Tert - butylhydroperoxyde.
URC =	Uncoupled respiratory control.
U.V. =	Ultra violet.

### Abréviations thermodynamiques.

$\delta \times P$ =	Excès de production d'entropie.
P =	Production d'entropie.
$\delta$ =	Entropie.
$X_i$ =	Forces.
$J_i$ =	Flux.
$P_0$ =	Production d'entropie initial.

# Plan .

## I. Introduction.

### 1. Théories du vieillissement cellulaire.

#### 1.1. Théories génétiques et déterminantes.

#### 1.2. Théories génétiques et stochastiques.

##### Théorie de la régulation génique.

##### Théorie de la différenciation terminale et de l'association des gènes au vieillissement.

##### Théorie de l'instabilité du génome.

#### 1.3. Théories environnementales.

##### Théorie de l'erreur catastrophique.

### 2. Thermodynamique et vieillissement.

#### 2.1. Systèmes ouverts proches de l'équilibre.

#### 2.2. Systèmes ouverts loin de l'équilibre.

#### 2.3. Evolution des systèmes ouverts en fonction du temps.

#### 2.4. Implication de la thermodynamique pour le vieillissement cellulaire.

### 3. Effets stochastiques de stress sur le vieillissement des cellules *in vitro*.

### 4. Application expérimentale de la théorie thermodynamique du vieillissement cellulaire.

#### 4.1. Modèle expérimental : les fibroblastes WI - 38.

#### 4.2. Influence des stress sur la proportion des morphotypes.

##### 4.2.1. Toxicité de l'éthanol.

##### 4.2.2. Toxicité du tert - butylhydroperoxyde (TBHP).

##### 4.2.3. Effets de stress uniques.

##### 4.2.4. Effets de stress successifs.

5. Rôle du métabolisme énergétique.

6. Contrôle du relargage des cellules (au niveau mitochondrial).

## II. Objectifs.

## III. Matériels et méthodes.

### 1. Culture des fibroblastes.

#### 1.1. Matériels.

#### 1.2. Méthodes.

##### 1.2.1. Repiquage des cellules.

##### 1.2.2. Congélation des cellules.

##### 1.2.3. Décongélation des cellules.

### 2. Test de cytotoxicité.

#### 2.1. Etude de l'effet cytotoxique de stress cellulaires.

##### 2.1.1. Matériels.

##### 2.1.2. Méthodes.

#### 2.2. Mesure de la toxicité par dosage de protéines.

##### 2.2.1. Matériels.

##### 2.2.2. Méthodes.

#### 2.3. Effet de la composition du milieu utilisé lors d'un stress.

##### 2.3.1. Matériels.

##### 2.3.2. Méthodes.

### 3. Stress cellulaires et morphotypes.

#### 3.1. Détermination des types morphologiques.

##### 3.1.1. Matériels.

##### 3.1.2. Méthodes.

3.2. Stress succesifs.

3.2.1. Matériels.

3.2.2. Méthodes.

3.3. Effets de la composition du milieu utilisé lors de stress.

3.3.1. Matériels.

3.3.2. Méthodes.

3.4. Détermination de l'effet de stress multiples et de la composition du milieu de stress sur le vieillissement accéléré par le test de la  $\beta$  - galactosidase.

3.4.1. Matériels.

3.4.2. Méthodes.

4. Etude de la respiration au cours du vieillissement.

4.1. Mesure de la consommation d'oxygène.

4.1.1. Matériels.

4.1.2. Méthodes.

4.2. Effets d'un agent découplant sur la chaîne respiratoire.

4.2.1. Matériels.

4.2.2. Méthodes.

4.3. Mesure de l'osmolarité du milieu de resuspension.

4.3.1. Matériels.

4.3.2. Méthodes.

5. Tests de survie cellulaire.

5.1. Méthode au bromure d'éthidium et acridine orange.

5.1.1. Matériels.

5.1.2. Méthodes.

5.2. Méthode au MTT.

5.2.1. Matériels.

5.2.2. Méthodes.



## IV. Résultats et discussion.

1. Rôle du métabolisme énergétique dans la survie des cellules à des stress.
  - 1.1. D - glucose.
  - 1.2. Vitamine E (ou  $\alpha$  - tocophérol).
  - 1.3. N - Acétyl - L - Cystéine.
  - 1.4. Recherche de la protection de survie cellulaire contre les stress en agissant sur le métabolisme calcique des mitochondries.
2. Effet du métabolisme énergétique et des antioxydants sur le vieillissement accéléré provoqué par les stress.
3. Etude de la respiration au cours du vieillissement.
  - 3.1. Perméabilisation des fibroblastes WI - 38.
  - 3.2. Protocole d'essais.
  - 3.3. Résultats.
  - 3.4. Tentatives d'explication.
    - 3.4.1. ADP.
    - 3.4.2. Osmolarité du milieu de resuspension.
    - 3.4.3. Composition du milieu de resuspension.
    - 3.4.4. Tests de « survie cellulaire ».
    - 3.4.5. Méthode au MTT.
    - 3.4.6. Implications de l'état de confluence.
    - 3.4.7. Effet d'un agent découplant sur la chaîne respiratoire.

## V. Conclusion et perspectives.

## VI. Bibliographie.

# I. Introduction.

## 1. Théories du vieillissement cellulaire (fig. 1).

Dans les théories du vieillissement, les adjectifs « déterministe », « programmé », « génétique » sont souvent considérés comme synonymes et opposés à stochastique. Nous allons donc les définir et les différencier afin d'en percevoir les subtilités.

Un phénomène est régi par des lois stochastiques s'il comporte des variables aléatoires qui font qu'il est en partie le fruit du hasard et doit être étudié en faisant appel à des calculs probabilistes.

Par contre, un phénomène est dirigé par des lois déterministes si un nombre limité de variables non aléatoires permettent de le décrire et évoluent exactement de la même manière à chaque production du phénomène considéré, sans faire appel à aucun calcul probabiliste. Ici, le terme « déterministe » est assimilé au terme programmé.

Donc, si toutes les modifications sont programmées dans le génome, le vieillissement doit être considéré comme un phénomène purement déterministe. Si elles ne sont pas totalement programmées dans le génome alors, le vieillissement doit être considéré comme un phénomène en partie stochastique.

Nous allons brièvement passer en revue les grandes catégories de théorie du vieillissement cellulaire.

### 1.1. Théories génétiques et déterministes.

Il va de soi que la machinerie d'expression génique de la cellule a servi de base lors de la création des théories puisqu'elle détient l'information responsable de la stabilité et de l'existence du système cellulaire. Si toutes les théories déterministes sérieuses sont génétiques, les théories génétiques ne sont pas toutes déterministes pour autant. Pour que le vieillissement puisse s'expliquer par des théories qui soient à la fois génétiques et déterministes, il doit exister un nombre restreint de gènes présents tout au long de la vie d'une cellule ou d'une lignée cellulaire et régissant le vieillissement. Ces gènes doivent être responsables d'une cascade précise d'expression / répression, s'enchaîner au cours de la vie depuis la création de l'oeuf, ce qui revient à être capables de déterminer un moment à partir duquel d'autres gènes devront s'allumer ou s'éteindre en entraînant le vieillissement de la cellule.

Théories génétiques		Théories environnementales
Théories déterministes	Théories stochastiques	Théories stochastiques
	altérations du génome en particulier	altérations des constituants cellulaires en général
Exemples de théories	Exemples de théories	Exemples de théories
<p><u>- Activation d'un programme</u></p> <p>Effets directs d'hormones ou de facteurs neuronaux sur l'activation du programme</p> <p><u>- Gènes spécifiques de vieillissement</u></p> <p>Expression différentielle de gènes chez les cellules jeunes ou vieilles</p>	<p><u>- Régulation génique</u></p> <p>Niveau <math>\neq</math> d'expression des gènes de réparation et de défense</p> <p><u>- Différenciation terminale</u></p> <p><u>- Instabilité du génome</u></p>	<p><u>- Théorie généralisée de l'erreur catastrophique</u></p> <p>- Radicaux libres</p> <p>- Accumulation de déchets métaboliques (ex : lipofuchine)</p> <p>- Augmentation du niveau des modifications dues aux diverses perturbations (<math>T^o</math>, pH, force osmotique, hypoxie, molécules toxiques) encourrues pendant la vie cellulaire</p>

Figure 1 . Récapitulatif des théories du vieillissement cellulaire.



Parmi ces théories déterministes et génétiques, on retrouve celle de l'activation d'un programme après la période de reproduction ou après une modification environnementale et faisant intervenir des hormones ou des facteurs neuronaux (**Kirkwood et Cremer, 1982**).

- Exemples: - Chez les nématodes *Caenorhabditis elegans*, un gène lié au vieillissement « age 1 » a été identifié.
- Des hormones sexuelles qui déclenchent un programme menant à la mort rapidement, ont été identifiées chez le saumon.

Plus récemment, on a découvert de nombreux gènes exprimés différemment au cours du vieillissement cellulaire. Certains auteurs y voient un argument en faveur des théories déterministes (**Campisi et al., 1996**) et d'autres y voient des arguments en faveur de théories stochastiques où certains gènes voient leur niveau d'expression changer à la suite de dommages à la chromatine ou de changement de potentiel redox à l'intérieur du cytoplasme conduisant à des modifications dans les processus d'activation des systèmes de régulation comme par exemple certaines cascades de kinases sensibles aux radicaux libres (**Remacle et al., 1992**).

- Exemples: Mise en évidence: - des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire observée lors du vieillissement des cellules mitotiques.
- de deux gènes fortement exprimés chez les vieilles cellules codant respectivement pour la sous-unité 4 de la NADH déshydrogénase et pour le cytochrome b.

Il existe une liste non exhaustive des gènes les plus importants qui peuvent être soit surexprimés, soit sous exprimés ou repressés chez les fibroblastes senescents humains (**pour une revue, voir Campisi et al., 1996**) (fig. 2).

## 1.2. Théories génétiques et stochastiques.

Parmi ces théories, nous décrirons plus particulièrement la théorie de la régulation génique, la théorie de la différenciation terminale et de l'association de gènes au vieillissement et la théorie de l'instabilité du génome.



# A.

## Some Genes That Are Repressed or Underexpressed in Senescent Human Fibroblasts

Gene/protein	Description/function	Expression	References
cdk2	Cyclin-dependent protein kinase-2	G1	Afshari <i>et al.</i> (1993)
cycA	Cyclin A, activator of cdk kinase	Late G1	Stein <i>et al.</i> (1991); Afshari <i>et al.</i> (1993)
cycB, cdc2	Active cdc2 kinase components	G2/M	Stein <i>et al.</i> (1991)
DHFR	Dihydrofolate reductase	Late G1/S	Pang and Chen (1993, 1994)
E2F1	Component of E2F transcription factor	Mid-late G1	Dimri <i>et al.</i> (1994)
EPC1	Serine protease inhibitor	G0	Pignolo <i>et al.</i> (1993)
c-fos	Component of AP-1 transcription factor	Early G0/G1	Seshadri and Campisi (1990)
gas1, gas6	Growth arrest-specific genes	G0	Cowled <i>et al.</i> (1994)
his2a,2b,3,4	Replication-dependent histones	Late G1/S	Zambetti <i>et al.</i> (1987); Seshadri and Campisi (1990)
hsp70, 90	Heat shock proteins 70 and 90	Stress-inducible late G1/S	Liu <i>et al.</i> (1989); Choi <i>et al.</i> (1990); Luce and Cristofalo (1992)
Id1, Id2	Inhibitors of bHLH transcription factors	Early and mid-G1	Hara <i>et al.</i> (1994)
IGF1	Insulin-like growth factor-1	G1	Ferber <i>et al.</i> (1993)
IL-6	Interleukin-6 multifunctional cytokine	G1	Goodman and Stein (1994)
L7	Large ribosomal subunit protein	Constitutive	Seshadri <i>et al.</i> (1993)
mig-5	Tissue inhibitor of metalloproteinase	G0/G1	Wick <i>et al.</i> (1994)
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen/ DNA polymerase $\delta$ function	Late G1/S	Chang <i>et al.</i> (1991)
pol $\alpha$	DNA polymerase $\alpha$	Late G1/S	Pendergrass <i>et al.</i> (1991)
RNR	Ribonucleotide reductase	Late G1/S	Pang and Chen (1993, 1994)
TIMP-1	Tissue inhibitor of metalloproteinase	G0	West <i>et al.</i> (1989); Millis <i>et al.</i> (1992)
TK	Thymidine kinase	Late G1/S	Pang and Chen (1993, 1994)
TS	Thymidylate synthetase	Late G1/S	Pang and Chen (1993, 1994)

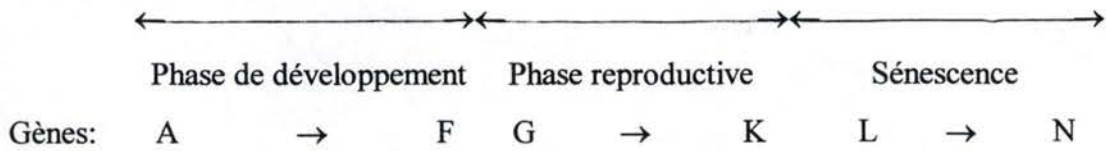
# B.

## Some Genes That Are Overexpressed by Senescent Human Fibroblasts

Gene/protein	Description/function	References
Cathepsin B	Protease	DiPaolo <i>et al.</i> (1992)
Collagen, $\alpha 1$ , 2 (I)	Extracellular matrix component	Murano <i>et al.</i> (1991)
Collagenase	Protease; extracellular matrix remodeling	West <i>et al.</i> (1989); Millis <i>et al.</i> (1992)
Cyclins E and D	Regulatory components of cdks	Dulic <i>et al.</i> (1993)
EF1 $\alpha$	Protein synthesis elongation factor	Giordano <i>et al.</i> (1989)
Fibronectin	Extracellular matrix component	Porter <i>et al.</i> (1990); Murano <i>et al.</i> (1991)
IGFBP-3	Insulin-like growth factor binding protein	Murano <i>et al.</i> (1991)
IL-1	Interleukin-1 $\alpha$ and -1 $\beta$ cytokines	Kumar <i>et al.</i> (1992)
p21 (sdi1)	Cyclin-dependent kinase inhibitor	Noda <i>et al.</i> (1994)
SAG	Senescence-associated gene, function unknown	Wistrom and Villeponteau (1992)
Statin	Nuclear protein, associates with pRb	Wang (1985)
Stromelysin	Protease; extracellular matrix remodeling	Millis <i>et al.</i> (1992)
WS3-10	Calcium binding protein	Liu <i>et al.</i> (1994a,b)

Figure 2. Exemples de gènes qui peuvent être surexprimés, réprimés, sous - exprimés (A) ou surexprimés (B) dans les fibroblastes humains sénescents. (d'après Campisi et al., 1996).

## Théorie de la régulation génique (Kanungo, 1980).



Cette théorie postule l'existence de répressions et l'activation de gènes qui conduiraient à la phase de développement et de croissance de l'embryon jusqu'à sa phase reproductive. Les produits et sous-produits de ces gènes seraient responsables du dernier stade de développement. Celui-ci proviendrait de l'activation séquentielle des gènes A jusque F; le produit du gène A allumant le gène B et ainsi de suite, sans qu'il existe de réel programme au sens déterministe du terme.

Dans l'exemple donné ci-dessus, les produits des gènes de la phase de développement (ici, A à F) seront responsables par leurs effets combinés de l'activation des gènes de la phase de reproduction (ici, de G à K), conduisant eux-mêmes, par leur combinaison au déclenchement de la sénescence (ici, gènes L à N).

Au fur et à mesure de la phase de reproduction, il peut y avoir une réduction de l'expression de certains gènes; le fait que des gènes s'éteignent peut provoquer la détérioration de certaines fonctions. Certains facteurs se trouvent parfois augmentés, agissent sur l'activation de gènes indésirables et provoquent alors des maladies autoimmunes, par exemple.

Selon cette théorie, les altérations existant dans l'expression des gènes ne changent pas seulement la durée d'une phase mais également la durée totale de vie.

Cependant, cette théorie devient obsolète du fait de la découverte d'autres facteurs qui peuvent déclencher des maladies graves dont l'apparition est d'autant plus favorisée que l'on atteint un âge avancé. C'est le cas, par exemple, de nombreux cancers dont l'apparition est liée à une suite de mutations dans la séquence nucléotique de certains gènes, dont des proto-oncogènes devenant alors oncogènes.



## Théorie de la différenciation terminale et de l'association des gènes au vieillissement (pour une revue, Cutler, 1991).

Cutler définit le vieillissement comme étant dû à des modifications de l'expression génique qui entraînent une différenciation terminale encore appelée « dysrégulation » terminale des cellules. Concernant les principaux facteurs impliqués dans le processus de « dysrégulation » génique, cette théorie de différenciation terminale diffère de celle de la régulation génique de Kanungo.

Alors que la théorie de la régulation génique met l'accent sur une variation des interactions protéines-ADN due à une modification du métabolisme général marquant la fin de la phase de reproduction, Cutler propose que ces modifications de la régulation génique soient dues en partie aux effets du métabolisme de l'oxygène, celui-ci étant la cause de la production de radicaux libres.

Les moyens de défense des organismes face aux radicaux libres doivent être pris en compte. Plus la régulation des gènes permet une lutte efficace contre les radicaux libres, plus une espèce aura une longévité importante (Cutler, 1982).

Cette théorie est stochastique dans sa nature puisque ne peut prédire quelles sont les cibles précises des radicaux libres par exemple, donc quels seront les gènes directement touchés. Cette théorie peut être étendue à tous les systèmes de défense, de réparation ou d'élimination de dommages comme par exemple, les systèmes d'élimination des protéines altérées, notamment par les chocs thermiques.

Cette dysrégulation génique proposée par Cutler peut être à la base du vieillissement cellulaire mais aussi de l'organisme tout entier si elle touche les tissus neuro-endocrino-immuns. En effet, le vieillissement de ces tissus a des effets profonds non seulement sur leur fonctionnement mais aussi sur celui de nombreux autres types cellulaires. Par exemple, les modifications du système immunitaire observées avec le vieillissement auront un effet déterminant sur la production de cytokines, facteurs de croissance, molécules chimiotactiques, ... des cellules immunes, et donc par delà, un effet sur la résistance des tissus face aux agents pathogènes ou à la transformation cellulaire, donnant lieu à des cellules malignes.

## Théorie de l'instabilité du génome (pour une revue, voir Slagboom et Vijg, 1989).

L'exposition de l'ADN au simple effet de la température ambiante a des conséquences sur la stabilité, comme c'est le cas de toute molécule chimique. L'ADN est exposé aux radicaux libres produits notamment par la respiration mitochondriale; à la suite de modifications chimiques ou d'erreurs réalisées par les enzymes de réparation de l'ADN, des transformations sont observées dans les bases des nucléotides de l'ADN, conduisant parfois à des mutations (remplacement de bases de l'ADN par d'autres).

S'il existe toute une panoplie d'enzymes de réparation de l'ADN, toutes ces modifications ne sont cependant pas réparées. Prenons l'exemple des télomères qui sont les séquences terminales, linéaires et riche en guanine des chromosomes. A chaque réplication, la DNA polymérase laisse des bases non répliquées à l'extrémité des télomères. La longueur de ces séquences hautement répétitives chez l'homme, diminue au cours du vieillissement alors qu'elle est constante pour les cellules germinales ou tumorales (Harley et al., 1995; Allsopp et al., 1992; Levy et al., 1992). On sait maintenant que le maintien de la longueur des télomères dépend de la présence d'une enzyme, la télomérase. Celle-ci reconstruit les télomères et son expression génique est activée seulement dans les cellules germinales et tumorales et non pas dans les cellules fœtales, post-natales ou adultes (Counter et al., 1992, 1994; Kim et al., 1994). Actuellement, les recherches sont ciblées sur la détermination du rôle précis des télomères sur le vieillissement cellulaire : le raccourcissement est-il la cause ou la conséquence du vieillissement ? Mystère !

Un autre exemple est la perte au hasard d'une ou plusieurs copies de certains gènes au cours du temps. Il existe des copies totalement fonctionnelles et des pseudo-gènes non fonctionnels. Dans les séquences d'ADN des copies fonctionnelles peuvent survenir des délétions au cours du vieillissement. Ces copies peuvent ainsi devenir non-fonctionnelles et de manière conséquente l'expression d'un gène multi-copies va diminuer si une ou plusieurs copies est (sont) altérée(s).

### 1.3. Théories environnementales.

A partir des théories précédemment décrites, nous avons déjà perçu le rôle de l'environnement dans l'expression génique. Si l'on considère que l'environnement peut



aussi avoir un effet sur d'autres constituants cellulaires que l'ADN, on arrive alors à ce qui a été appelé les théories environnementales du vieillissement cellulaire.

### Théorie de l'erreur catastrophique.

Cette théorie a surtout une valeur historique car c'était une des premières fois qu'une théorie du vieillissement tenait compte d'un ensemble de fonctions cellulaires (expression génique, synthèse protéique, effets de rétro-inhibition, ...). Cette théorie a été émise par **Orgel (1963)** qui postulait que lorsqu'une erreur s'infiltrait au hasard de la machinerie de synthèse protéique, elle peut engendrer des erreurs dans la synthèse de nouvelles protéines puisque ce sont les protéines qui synthétisent l'ADN et l'ARN. Si ces erreurs ne sont pas rapidement corrigées, la théorie prévoit qu'elles peuvent s'amplifier et atteindre finalement un niveau incontrôlable provoquant une véritable catastrophe au niveau du fonctionnement cellulaire.

Actuellement, on a pu montrer que la fidélité de la traduction diminue avec l'âge mais que le processus n'a pas d'effet déterminant sur la longévité (**Goldstein et Moerman, 1975, Hardwick et al., 1981**).

Par exemple, le laboratoire de **Tom Kirwood** à Manchester a produit des animaux transgéniques présentant des ARN de transfert (ARNt) qui ne fournissent pas certains acides aminés correspondant au code génétique régissant la lecture de l'ARN messager (ARNm) par les ribosomes lors de la synthèse protéique; ces ARNt fournissent d'autres acides aminés à la place, ceci conduisant à des erreurs dans les séquences d'acides aminés de protéines.

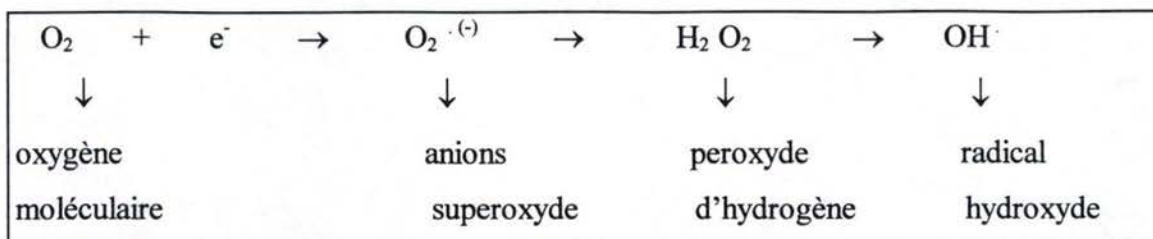
On n'est pas parvenu à obtenir des animaux transgéniques présentant des ARNt qui ne fournissent plus certains acides aminés cruciaux dans la structure tridimensionnelle des protéines (comme la proline), car ces mutations ne permettent pas la survie de l'oeuf, tout simplement.

Par contre, des modifications dans les séquences de protéines où certains acides aminés non cruciaux dans la structure tridimensionnelle sont remplacés par d'autres, permettent la survie de l'animal qui atteint l'âge normal et ne présente pas de signes de vieillissement précoce.

La théorie d'Orgel fut ensuite affinée, pour enfin porter le nom de théorie généralisée de l'erreur catastrophique (**Orgel, 1973**) tenant compte des différents systèmes générant des dommages et des systèmes de réparation correspondants. Parmi ces différents systèmes, on trouve ceux de production / élimination des radicaux libres, dérivés de

l'oxygène moléculaire, à l'origine de la théorie des radicaux libres. (**Harman, 1956, 1987; Sohal, 1989; Poot, 1991**).

Les radicaux libres sont des espèces chimiques contenant 1 électron non apparié dans une orbitale externe d'un de leurs atomes. Cet électron rend l'atome très réactionnel. La molécule d'oxygène possède deux électrons non appariés de même spin.



Lors de la respiration mitochondriale, des radicaux libres sont formés dans la cellule. En effet, 2 à 3 % des électrons véhiculés par la chaîne de transport d'électrons des membranes mitochondriales internes sont largués hors de ces membranes. Ils peuvent alors réagir avec l'oxygène et former ainsi des radicaux libres conduisant à ce que l'on appelle la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire formant successivement les anions superoxides, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle (**Basaga H., 1989**). Ces radicaux libres altèrent de nombreux constituants cellulaires (protéines, ADN, acides gras, ...) et jouent donc un rôle aussi bien dans la théorie de l'instabilité du génome que dans les théories environnementales.

D'autres théories ont été émises, par exemple, pour certains auteurs, le vieillissement pourrait dépendre de l'apparition de liens covalents ou faibles entre des macromolécules extracellulaires telles que le collagène (**Yamauci et al., 1988**) ou d'autres protéines intracellulaires entre elles ou avec de l'ADN. Cela aurait donc comme conséquence l'aggrégation et l'immobilisation de molécules formant par exemple la lipofuscine, une perte de fonctionnement et une plus grande résistance au catabolisme.

On comprend alors que la théorie généralisée de l'erreur catastrophique accepte toute une gamme de phénomènes liés aux interactions entre la cellule et son environnement. Par conséquent, les différentes théories du vieillissement ne s'excluent pas, elles sont complémentaires. Par exemple, les radicaux libres peuvent moduler la régulation des gènes et intervenir par ce biais dans la théorie de l'association des gènes au vieillissement.

On perçoit donc de suite qu'une unification de toutes ces théories était nécessaire.



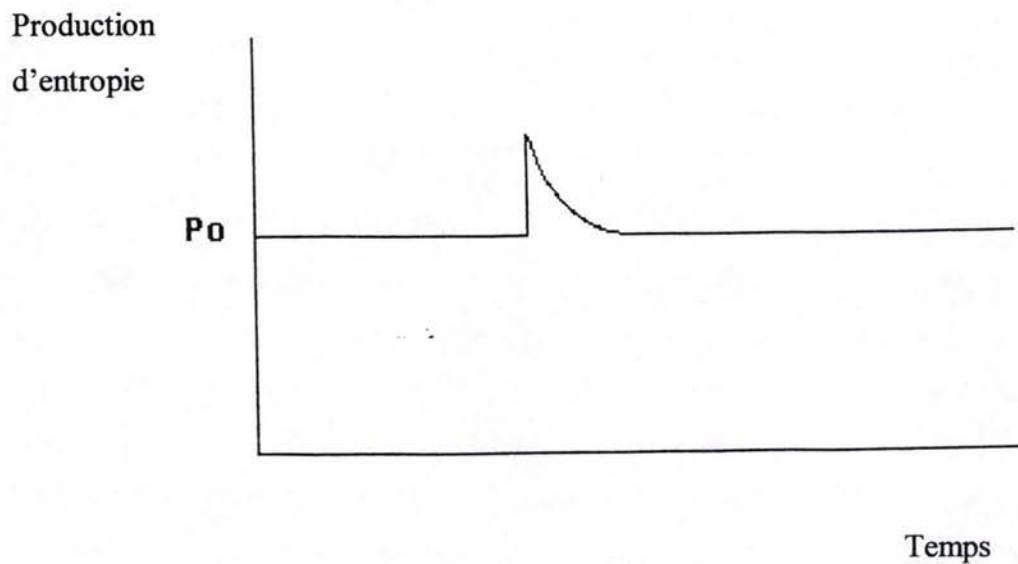


Figure 3. Illustration du théorème de Prigogine :

lorsqu'un système ouvert proche de l'équilibre est perturbé, il se comporte de manière à ce que sa production d'entropie  $P$  diminue, que la perturbation disparaisse. Il revient alors à sa valeur initiale de production d'entropie  $P_0$ .



Si le rôle de précurseur joué par Orgel est indéniable, sa théorie généralisée ne rendait pas compte de la manière dont la cellule, à un niveau global, finit par connaître une augmentation de son niveau d'erreurs concomitante à une perte d'efficacité de ses fonctions. Cette théorie ne parlait pas non plus de la manière dont la production et l'utilisation d'énergie libre régule les fonctions cellulaires avec le vieillissement. Dans cette optique, **Strehler (1986)** a suggéré d'utiliser la thermodynamique des systèmes ouverts afin d'obtenir une approche globale de l'évolution du système cellulaire au cours du temps, mais est resté évasif sur la voie précise à investiguer dans ce domaine. Notre laboratoire a entrepris cette étude dont nous donnons les résultats ci-dessous.

## 2. Thermodynamique et vieillissement (**Toussaint et al., 1991**).

La cellule peut être considérée comme un système ouvert par excellence, c'est-à-dire dans lequel règnent des échanges de matière et d'énergie avec l'environnement, tandis que les systèmes fermés n'échangent de l'énergie qu'avec le monde extérieur et les systèmes isolés n'effectuent aucun échange avec l'extérieur.

La thermodynamique des systèmes ouverts peut être divisée en deux parties:

- les systèmes décrits par des lois linéaires (proches de l'équilibre).
- les systèmes décrits par des lois non-linéaires (loin de l'équilibre).

### 2.1. Systèmes ouverts proches de l'équilibre.

Le premier niveau de complexité de la thermodynamique des processus irréversibles est constitué des systèmes ouverts proches de l'équilibre décrits par des lois linéaires.

**Prigogine (1947)** a proposé de considérer la variation de l'entropie générée par un système ouvert ( $\delta S$ ) comme la somme de deux termes :  $\delta_i S + \delta_e S$  où  $\delta S$  symbolise les échanges d'entropie avec l'extérieur et  $\delta_i S$ , l'entropie générée au coeur du système.

Prigogine énonce: « Si les entrées de matière et d'énergie sont constantes, alors la production d'entropie ( $\delta_i S / \delta t$ ) est constante et minimale ».

Par contre, « Si une perturbation a lieu, le système réagit et la production d'entropie va augmenter jusqu'à disparition de la perturbation pour retrouver le niveau d'entropie minimal et constant » (fig. 3).

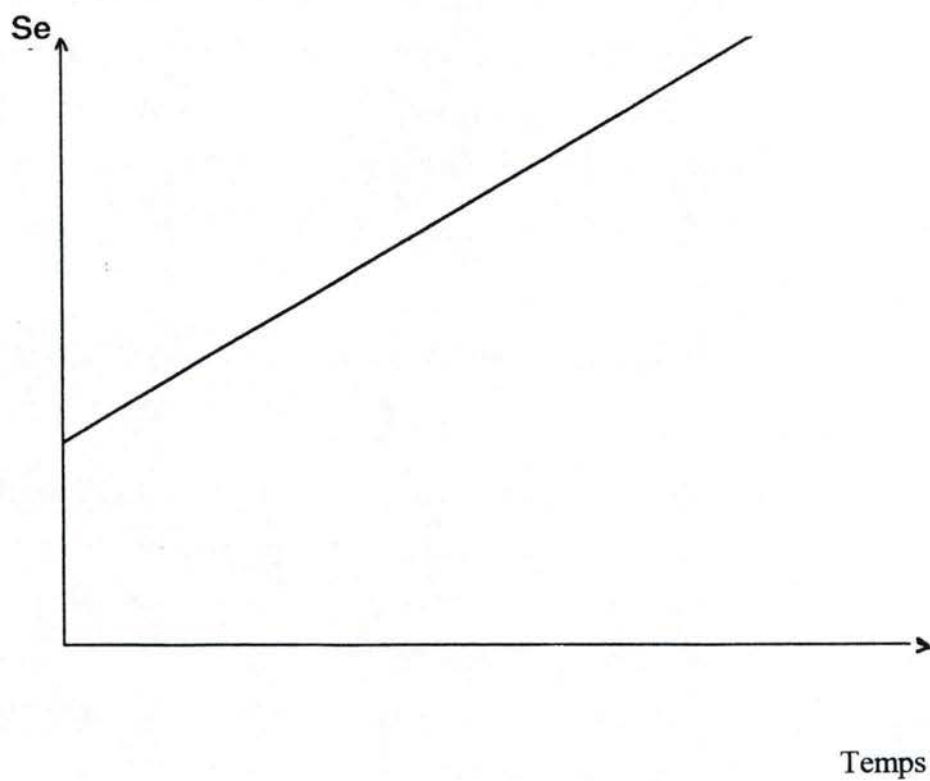


Figure 4 . Evolution de l'entropie d'un système ouvert proche de l'équilibre dans son état stationnaire.

La production d'entropie est constante au cours du temps

$(-\delta_e S / \delta t = \delta_i S / \delta t)$  et est totalement exportée vers

l'extérieur du système entraînant une augmentation

linéaire de l'entropie de l'environnement ( $Se$ ).



Plus précisément, pour l'entièreté du système, la variation totale d'entropie du système avec le temps ( $\delta S / dt$ ) est la somme des changements d'entropie de tous les éléments de volume constituant le système étudié.

Cette variation d'entropie du système est séparée en deux parties:

- l'entropie produite à l'intérieur du système ( $\delta_i S / \delta t$ ) par les processus irréversibles dus, par exemple, aux réactions (bio)chimiques ou aux gradients, par unité de temps.
- le flux total d'entropie vers l'extérieur généré, par unité de temps, par les flux diffusionnels de chaleur ou d'espèces chimiques différentes quittant le système à travers la surface qui l'entoure ( $\delta_e S / \delta t$ ).

$\delta_i S / \delta t$  est appelé production d'entropie du système et est symbolisé par  $P$  et n'a donc directement rien à voir avec l'organisation et le désordre du système,  $P$  est en fait une mesure du niveau « d'activité » du système : si le métabolisme est plus actif,  $P$  augmentera.

Si le système se trouve à l'état stationnaire, la production d'entropie ( $\delta S / dt$ ) est constante au cours du temps, donc  $\delta_i S / \delta t = - \delta_e S / \delta t$  autrement dit, toute augmentation momentanée de la production d'entropie du système est compensée par un flux d'entropie vers l'environnement (fig. 4).

## 2.2. Systèmes ouverts loin de l'équilibre.

Les systèmes biologiques à tous les niveaux de fonctionnement depuis les cellules jusqu'aux organismes sont des systèmes ouverts non linéaires.

Tout système peut être classé selon une dichotomie linéaire / non linéaire, lorsqu'on considère que les relations entre les forces qui y sont présentes (potentiel chimique par exemple) et des flux (vitesse de réaction chimique par exemple) qu'elles engendrent, sont linéaires ou non. Plus un système s'éloigne de l'équilibre, moins ces relations forces / flux obéissent à des lois linéaires, c'est pour cette raison que les systèmes où ces relations forces / flux sont non linéaires ont été appelés systèmes ouverts loin de l'équilibre par opposition aux systèmes proches de l'équilibre où ces relations forces / flux sont linéaires.

Pourquoi les cellules vivantes sont-elles des systèmes non linéaires ?

Outre les raisons complexes permettant l'existence même de leur structure, les cellules fonctionnent et sont régulées par des processus non linéaires. Nous citerons en exemple le fait que des voies métaboliques complexes nécessaires à la survie cellulaire (comme la



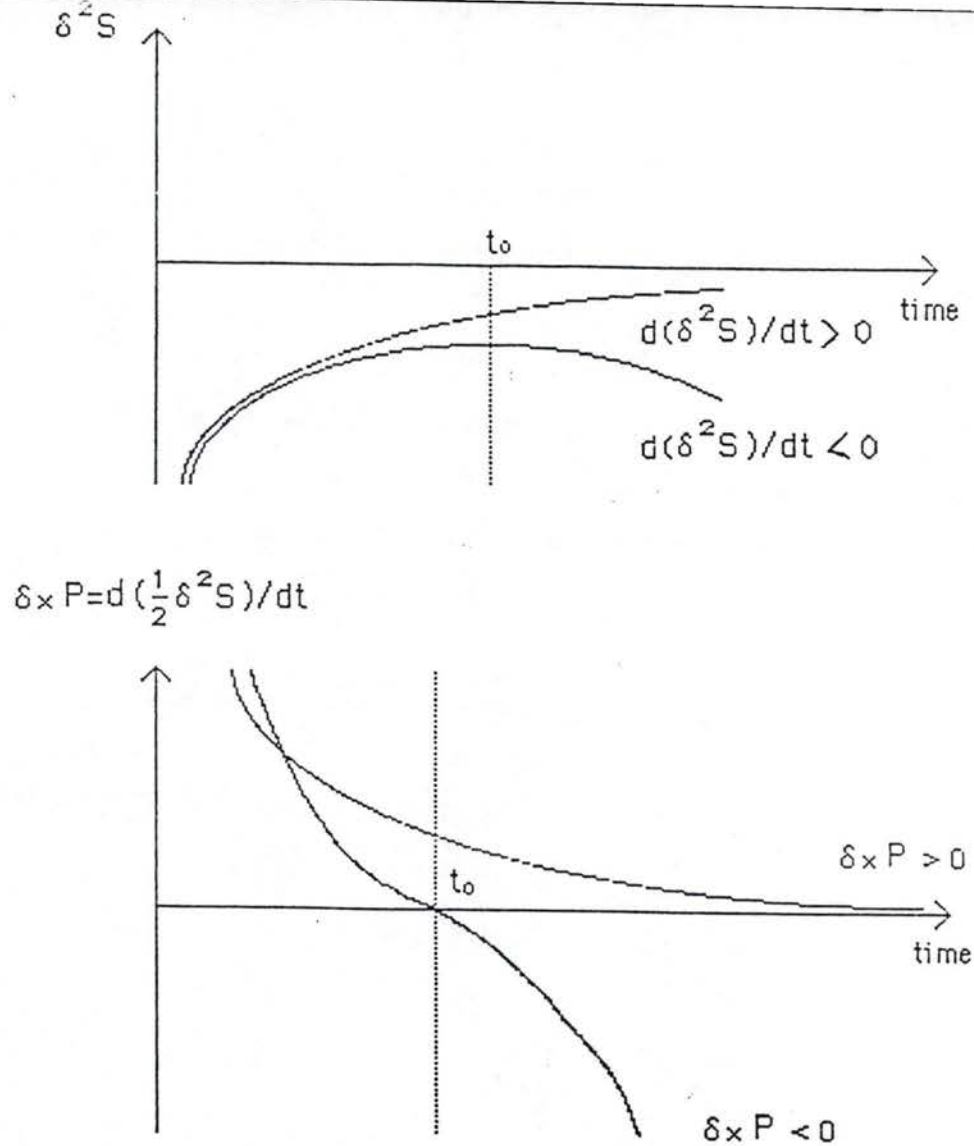


Figure 5. Critère de stabilité pour les états stationnaires loin de l'équilibre.

Des fluctuations causent une « augmentation » de  $\delta^2$  en valeur absolue ( $\delta^2 S$  devient en fait de plus en plus négatif). Si le système peut supprimer ces fluctuations alors,  $\delta^2 S$  devient moins négatif et se rapproche de 0, autrement dit, la pente de l'évolution de  $\delta^2 S$  en fonction du temps qui, est en fait  $\delta^2 S / \delta t$ , reste positif jusqu'à disparition des fluctuations. Dans ce cas, le système est stable [ $\delta^2 P = \delta (\delta^2 S / 2) / \delta t > 0$ ].

Si le système est incapable de diminuer les fluctuations alors,  $\delta (\delta^2 S) / \delta t$  devient de plus en plus négatif après un certain temps et alors la fluctuation de départ s'amplifie. Dans ce cas, le système est instable [ $\delta^2 P = \delta (\delta^2 S / 2) / \delta t < 0$ ] et cherche un nouvel état stationnaire qu'il trouvera ou non selon ses propres caractéristiques internes à sa structure.

production d'ATP) sont hautement régulées par des voies de rétro-inhibition négatives qui font qu'il n'y a pas de relation totalement linéaire entre le potentiel chimique dû à la présence en substrat et la formation d'ATP.

Le théorème de Prigogine n'est plus applicable aux systèmes loin de l'équilibre qui peuvent être caractérisés par plusieurs états stationnaires, chacun d'eux étant marqué par une production d'entropie spécifique:  $P = \delta i S / \delta t$  (entropie totale produite à l'intérieur du système). De plus, ils ne réagissent pas toujours de la même manière face aux fluctuations; aucun mécanisme ne garantit totalement le retour à l'état stationnaire de départ : on perçoit dans ce type de système la notion d'instabilité.

Le développement de la thermodynamique a permis l'établissement de critères de stabilité pour ces systèmes loin de l'équilibre. Toute fluctuation d'une ou plusieurs forces  $\delta X_i$  ou flux  $\delta J_i$  décrivant le système peut prendre de nombreuses valeurs qui dépendent du temps. Les forces et les flux ne sont plus liés par des lois linéaires.

Les critères de stabilité ont été établis en considérant le voisinage immédiat de l'état de stabilité avant toute perturbation caractérisée par une entropie  $S^0$  et une production d'entropie  $P^0$ . Si on réalise un développement de Taylor de  $S$  et  $P$ , on obtient :

$$S = S^0 + \delta S + \frac{1}{2} \delta^2 S + \dots$$

$$P = P^0 + \delta P + \frac{1}{2} \delta^2 P + \dots$$

Les termes de second ordre du développement de Taylor ( $\frac{1}{2} \delta^2 S$ ,  $\frac{1}{2} \delta^2 P$ ) sont intéressants en ce qui concerne la stabilité de ces systèmes en cas de perturbation.

Le terme  $(\frac{1}{2}) \delta^2 P$  est appelé excès de production d'entropie et aussi noté  $\delta_x P$

(Glansdorff et Prigogine, 1971); il résulte des fluctuations de toutes les forces et des flux du système en cas de modifications de paramètres internes ou externes au système.

En résumé, ce terme  $\delta_x P$ , lié à la variation des forces et des flux occasionnés lors d'une perturbation est  $\frac{1}{2} \delta^2 P = d(\frac{\delta^2 S_i}{dt}) / dt$ .

2

Glansdorff et Prigogine (1971) ont montré que les conditions de stabilité des états stationnaires loin de l'équilibre soumis à des perturbations sont données par  $S \times P \geq 0$ .

Si cet excès est positif, le système retrouvera son état stationnaire de départ.

Par contre, s'il est négatif, le système le quittera afin d'atteindre, si possible, un nouvel état stationnaire caractérisé par un niveau d'entropie moindre (fig. 5).

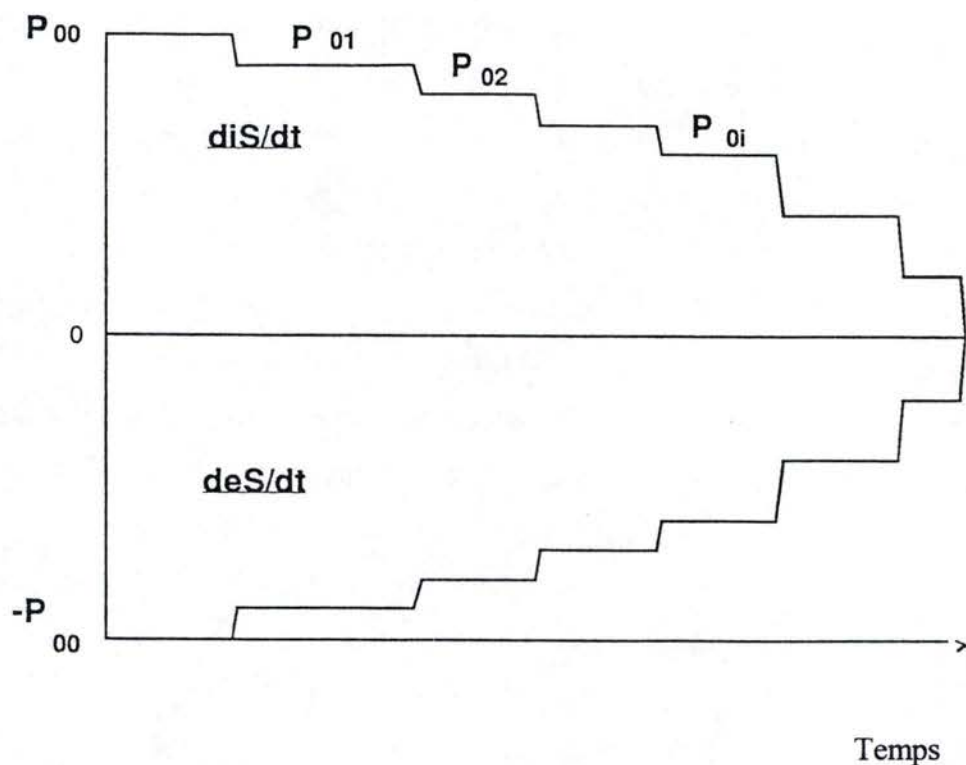


Figure 6. Evolution de la production d'entropie interne en fonction du temps.

Le niveau de la production d'entropie va augmenter graduellement en fonction du temps donnant lieu à des états stationnaires successifs. Dans de tels états, l'entropie produite sera totalement exportée puisque  $-\delta_e S = \delta_i S$ . Cependant, à chaque saut de production d'entropie d'un état stationnaire à l'autre, cette égalité est rompue jusqu'à ce qu'un nouvel état stationnaire de production d'entropie  $P_0$  soit atteint.



### 2.3. Evolution des systèmes ouverts en fonction du temps.

Dans le domaine non-linéaire, l'interdépendance des forces et des flux est complexe et difficile à évaluer. On peut décomposer le changement de la variation d'entropie au cours du temps  $\delta P / \delta t$  comme une différence due au changement des forces thermodynamiques ( $x_i$ ) alors que les flux restent constants ( $\delta x P / \delta t$ ) en plus de la contribution due au changement de flux ( $J_i$ ) lorsque les forces sont constantes ( $\delta J P / \delta t$ ).

En ce qui concerne la stabilité du système, seul le terme  $\delta x P / \delta t$  est essentiel et peut être examiné en analogie au terme  $\delta P / \delta t = 0$  défini dans le domaine linéaire (Babloyantz, 1986). Ce terme est négatif lorsque le système est entraîné hors de son état stationnaire. L'application d'un tel concept à un système comme une cellule est délicat puisqu'il est impossible d'isoler la part de production d'entropie produite par les forces seules de celle produite par les flux. Le problème a alors été considéré d'un point de vue qualitatif.

### 2.4. Implication de la thermodynamique pour le vieillissement cellulaire.

On peut imaginer la cellule à un moment précis comme étant à un état stationnaire où la production d'entropie exportée à l'extérieur du système soit :  $-\delta_e S / \delta t = -\delta_i S / \delta t$ . Si nous suivons le système au cours du temps, cette donnée n'est plus valable. En effet, si toute l'entropie produite dans la cellule était totalement exportée, la cellule pourrait être considérée comme éternelle, ce qui n'est absolument pas le cas des cellules normales.

Dans la réalité, on observe que les cellules au cours de leur vie, connaissent une diminution progressive de la production d'entropie corrélée avec une diminution au cours du temps de l'entropie exportée du système (fig. 6).

Rappelons que la production d'entropie d'un système ouvert, telle qu'une cellule dans un état stationnaire, représente la différence entre l'entropie des molécules et les flux entrant et quittant le système. On peut alors mieux comprendre que la production d'entropie est directement liée à la quantité d'énergie libre disponible dans la cellule. De fait, une diminution de la production d'entropie interne de la cellule peut représenter une diminution de sa capacité à transformer, avec le temps, l'énergie en travail; ce processus étant générateur d'entropie.

Figure 7. Effet de faibles stress sur la production d'entropie.

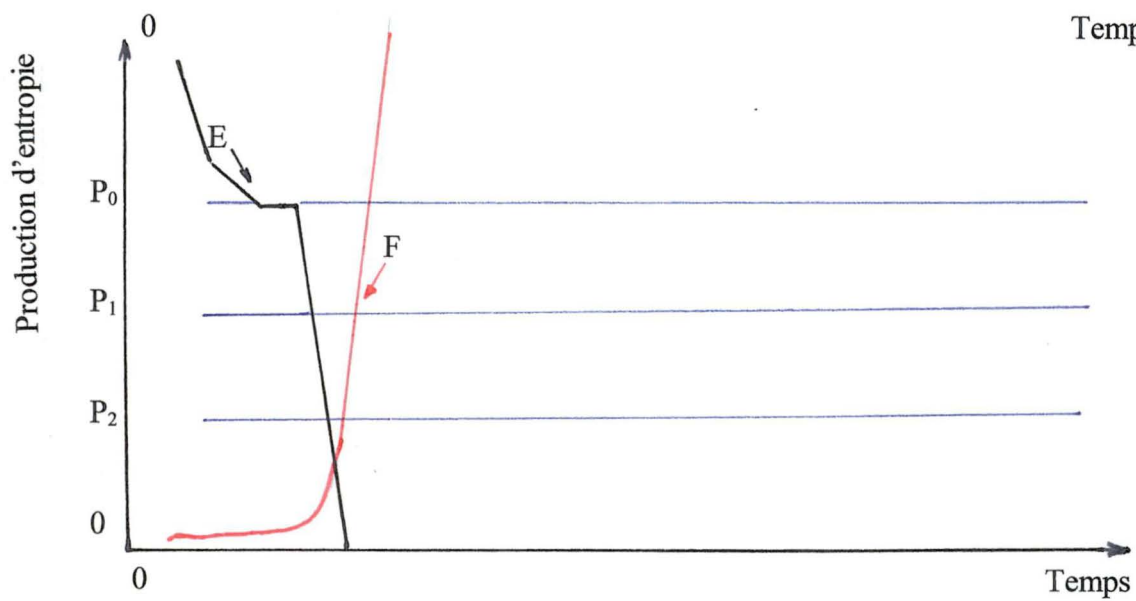
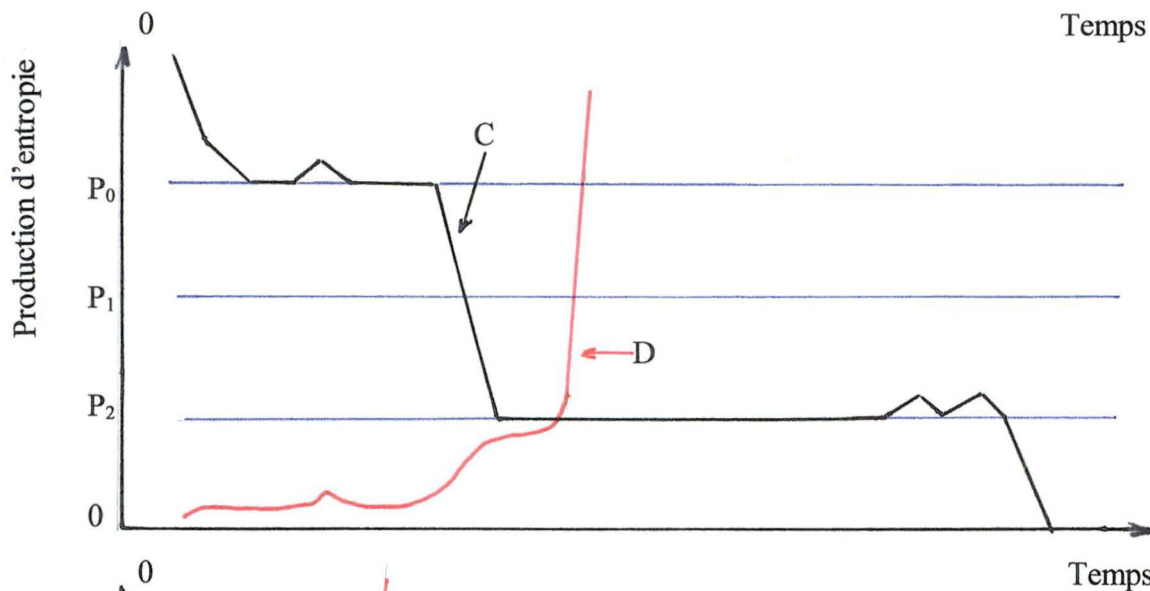
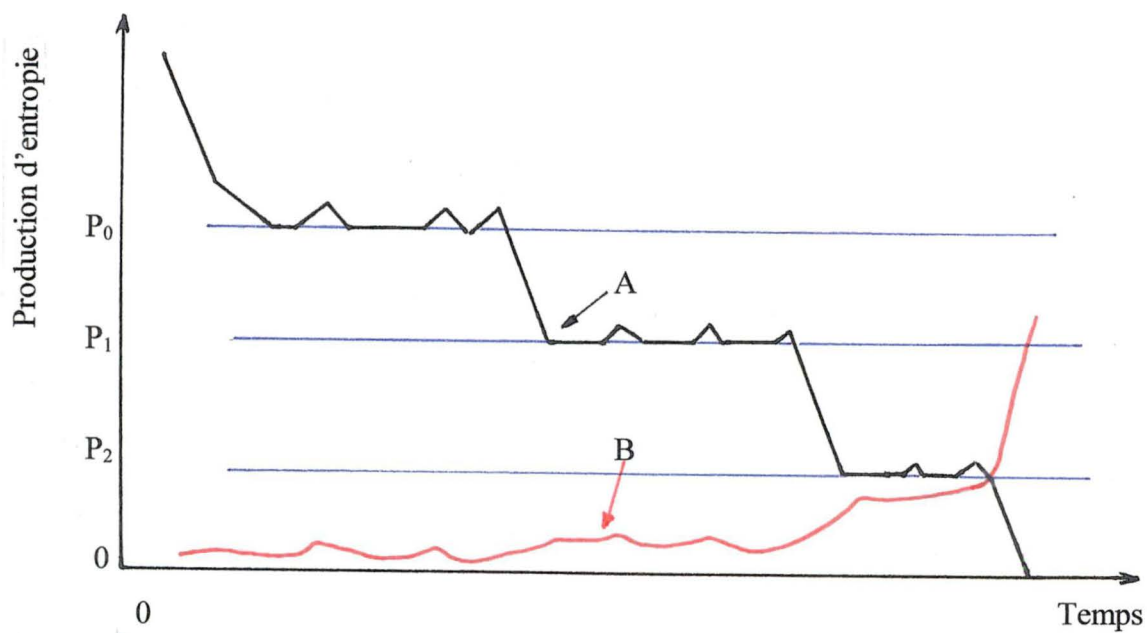
Le système réagit de manière à revenir à sa production d'entropie(A) et à son niveau d'erreurs (B) initiaux.

Effet de stress plus intenses sur la production d'entropie.

Un stress peut destabiliser le système si bien qu'il chute dans un nouvel état stationnaire caractérisé par une production d'entropie plus faible (C) et un niveau plus élevé d'erreurs que dans la situation initiale (D). La capacité de résister à des stress subséquents sera plus faible et le seuil critique d'accumulation d'erreurs sera facilement atteint.

Effet de stress très intenses sur la production d'entropie.

Le niveau d'erreurs devient tellement élevé que le système ne peut trouver de nouvel état stationnaire et finit par disparaître (E) et (F).





Cette affirmation générale comporte deux aspects:

- Pour une quantité donnée de molécules hautement énergétiques introduites dans la cellule, leur transformation en travail, en nouvelles molécules ou en énergies libres diverses peut diminuer. Le fonctionnement général de la cellule peut être moins efficace du fait des altérations différentes dans le fonctionnement cellulaire: augmentation d'erreurs dans la synthèse de protéines, accumulation de déchets (lipofuscine, ....), découpage partiel des mitochondries, variation dans certaines relations structurelles.
- la diminution de production d'entropie peut également provenir d'une baisse générale de production d'énergie libre utilisable par la cellule.

Le vieillissement est associé à une baisse de production de chaleur et de la respiration.

Par exemple, l'intensité de la respiration diminue dans la plupart des organes et tissus de rats âgés (Nagorny et al., 1963). Hayflick et Finch (1977) ont fait une revue des expériences réalisées sur des fractions et homogénats de tissus et arrivent aux mêmes conclusions.

Au niveau cellulaire, le métabolisme de base diminue avec le temps, plus spécialement dans les cellules les plus métaboliques actives telles que hépatocytes ou les cellules musculaires (Byrne et al., 1991). Ces auteurs proposent que l'altération du métabolisme oxydatif des cellules post-mitotiques soit un facteur majeur dans leur vieillissement. Selon ces conceptions, les systèmes biologiques vont présenter une baisse générale des fonctions cellulaires et du métabolisme, résultat de perturbations venant de l'environnement cellulaire ou d'une baisse de l'efficacité de la régulation générale du métabolisme contrôlé génétiquement.

Le vieillissement cellulaire est un phénomène complexe qui varie selon l'état de différenciation et espèce. Cependant, dans chaque type cellulaire, il s'agit d'un processus irréversible dépendant du temps et conduisant graduellement à la mort cellulaire, que ce soit par nécrose ou apoptose.

La thermodynamique indique que la cellule, considérée comme un système loin de l'équilibre, fonctionne à un minimum de production d'entropie mais, plusieurs minima étant possibles, le vieillissement de la cellule peut être considéré comme étant le passage graduel par ces différents états présente une stabilité potentielle (fig. 7).

Pour mieux comprendre ce processus, il faut introduire le rôle des systèmes de défense, de protection, de réparation que possèdent la cellule afin de prévenir l'accumulation d'erreurs, évitant ainsi une baisse précoce et anormale de la production d'entropie.

Si ces systèmes n'existaient pas, l'augmentation d'erreurs internes serait très rapide et conduirait à une baisse brutale de la production d'entropie. Cette dernière se voit rapidement diminuée et la cellule ne pourrait plus maintenir son métabolisme de base et, par conséquent, mourrait plus rapidement.

En conclusion, l'évolution de la cellule vers des états stationnaires caractérisés par des niveaux de production d'entropie plus faibles doit probablement tenir compte du rôle de défense des différents systèmes de protection contre des stress de natures multiples.

### 3. Effets stochastiques de stress sur le vieillissement des cellules *in vitro*.

Distinguons 3 catégories d'intensité de stress afin de pouvoir déterminer leur effet sur le vieillissement cellulaire (fig. 7).

Distinguons tout d'abord :

1. les stress omniprésents de faible intensité comme les faibles variations de température, de pH, de composition ionique, augmentation temporaire de la concentration en radicaux libres endommageant continuellement les constituants cellulaires, les excès ou pénuries de nutriments, etc. Les dégâts produits sont réparés en permanence et le système cellulaire reste à son état stable de production et d'utilisation énergétique.

Il est néanmoins possible que quelques erreurs irréversibles soient produites lors de ce type de stress. Dans ce cas, d'autres fonctions cellulaires pourront essayer de les contrecarrer. Thermodynamiquement, lorsque le système reviendra au niveau stationnaire antérieur après de faibles perturbations générant néanmoins des erreurs irréversibles, quelques forces  $X_i$  seront augmentées et d'autres diminuées mais tout en présentant une variation globale nulle des forces résultant de la fluctuation (Toussaint O. et al., 1991).

2. les stress répétés sur une courte période de temps ou stress intenses résultant de situations tout à fait anormales pour les cellules telles que certaines conditions pathologiques: inflammations dans un tissu, exposition des cellules aux U.V. , ischémie-reperfusion, présence de molécules toxiques, etc.



Les systèmes de défense de la cellule seront mis à rude contribution, se verront dépassés voire altérés. Une surexpression de certains éléments de systèmes de défense, comme par exemple la superoxyde dismutase dans le système antioxydant, sera parfois nécessaire. Des dommages pourront se propager comme par exemple les radicaux libres non détruits par le système antioxydant pourront réagir avec l'ADN et nécessiteront l'induction d'enzymes de réparation de l'ADN, processus bien sûr très coûteux d'un point de vue énergétique.

Si ces systèmes sont capables de corriger les erreurs, la cellule retrouvera son état stationnaire de départ. S'ils en sont incapables, il est possible d'observer une altération de certains constituants structuraux, de certaines fonctions de base ou de régulation (par exemple: les enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique de la cellule et leur régulation).

Le comportement de la cellule dépendra fortement de l'intensité et de la vitesse de réparation par rapport à l'intensité du stress. Une destabilisation du système cellulaire est alors permise thermodynamiquement parlant.

La cellule devra alors soit:

- retrouver un nouvel état stationnaire ayant un niveau d'accumulation d'erreurs plus élevé et de production d'entropie plus faible correspondant à un niveau d'intensité métabolique plus faible et donc à une plus grande fragilité envers un stress ultérieur.
- mourir car incapable de faire face au niveau d'erreurs généré par le stress (**Toussaint et al., 1991**).

3. stress d'une telle intensité que la cellule est incapable de trouver un nouvel état stationnaire. Ne pouvant plus assurer ses fonctions métaboliques, elle dégénère et meurt (**Toussaint et al., 1991**).

#### 4. Application expérimentale de la théorie thermodynamique du vieillissement cellulaire.

Au laboratoire, nous avons testé l'effet de stress de natures différentes sur la survie des cellules et sur leur vieillissement de manière à savoir si les stress peuvent bel et bien accélérer le processus de vieillissement normal et si les systèmes de défense et de production d'énergie peuvent contrecarrer le processus de vieillissement accéléré.



- ## Phase I

- ## Phase II

- ### Phase III

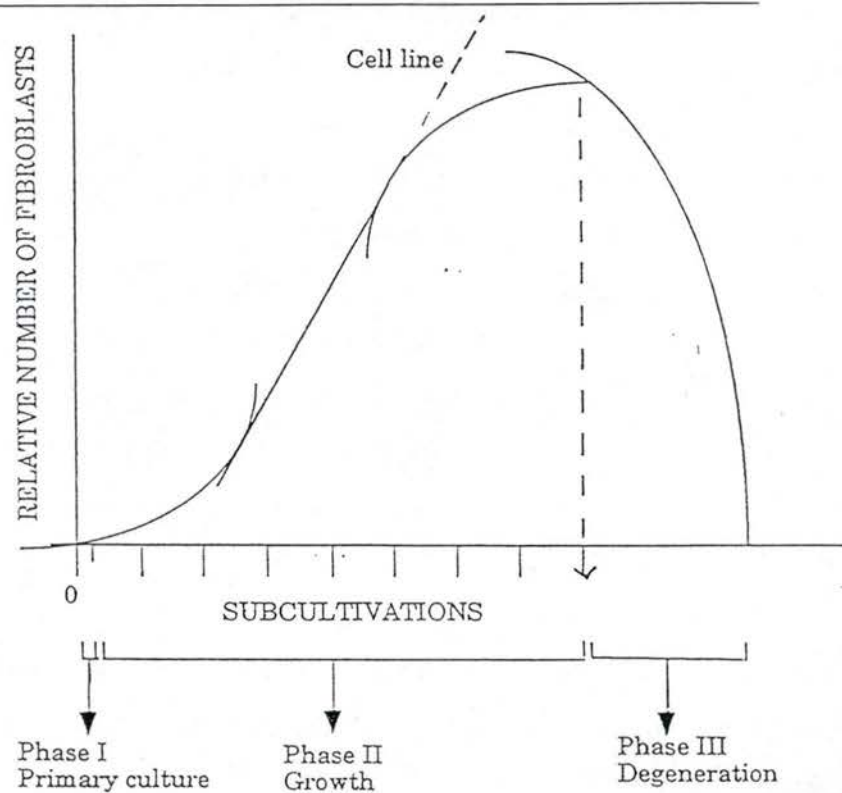


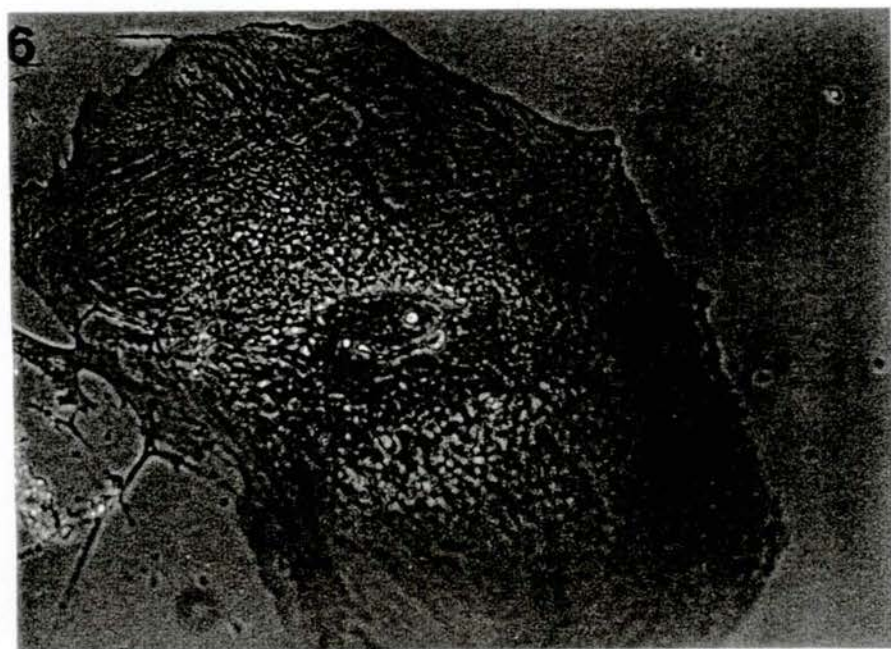
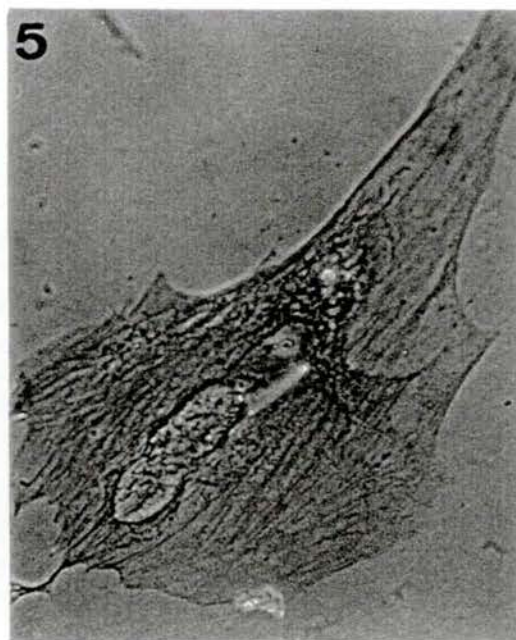
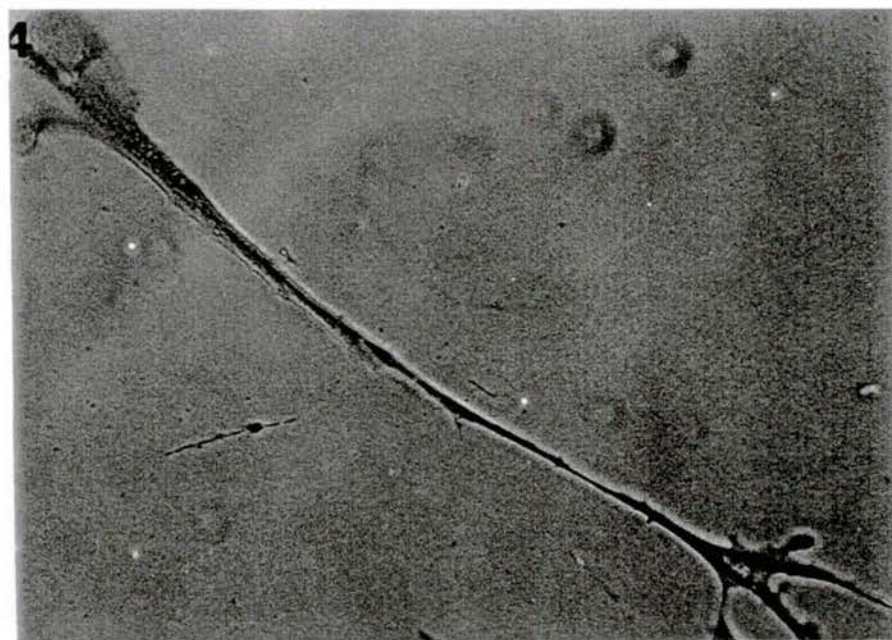
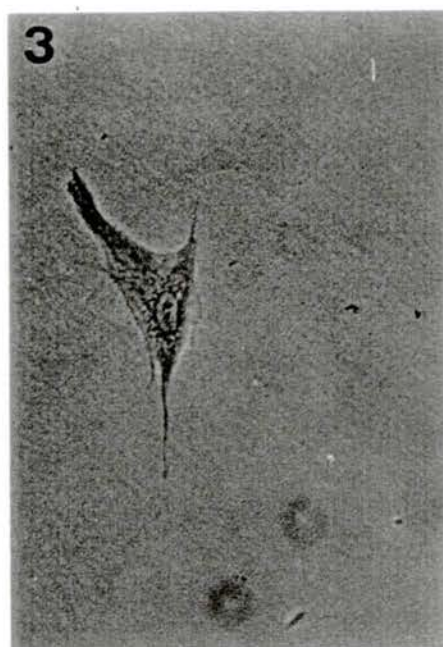
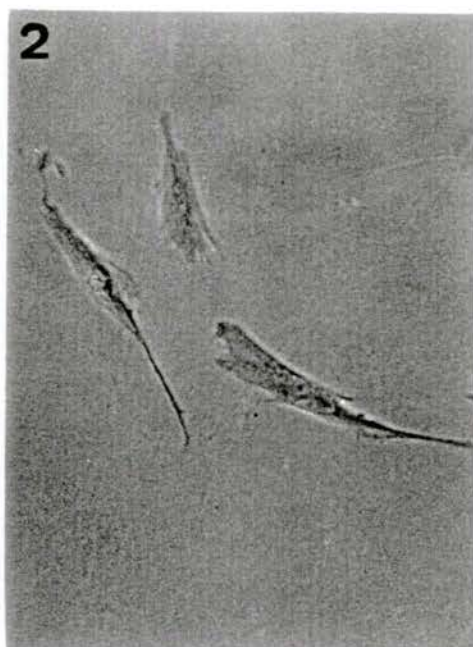
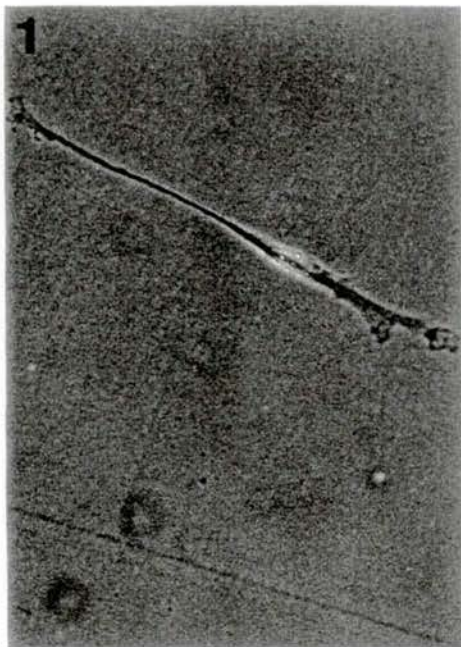
Figure 8. Evolution de la culture de fibroblastes d'embryon humain depuis sa mise en culture (phase I), sa croissance exponentielle (phase II), sa période de déclin (phase III) précédant la mort des cellules (**Hayflick, 1965**).

Figure 9. Caractéristiques morphologiques des fibroblastes WI - 38.

1. Fibroblastes mitotiques MF I,
2. Fibroblastes mitotiques MF II,
3. Fibroblastes mitotiques MF III,
4. Fibroblastes post-mitotiques PMF IV,
5. Fibroblastes post-mitotiques PMF V,
6. Fibroblastes post-mitotiques PMF VI (grossissement 180 x).

Les fibroblastes post-mitotiques en état de dégénérescence PMF VII ne sont pas ici représentés.







#### 4.1. Modèle expérimental: les fibroblastes WI - 38.

Il est intéressant de se demander pourquoi le temps influence de manière fondamentale un système aussi perfectionné qu'une cellule qui peut se défendre, réparer ses dégâts et se diviser plus ou moins rapidement ?

Léonard Hayflick fut le premier à se rendre compte que les cellules humaines, en culture, avaient une durée de vie limitée (**Hayflick et Moorhead, 1961**). En effet, il a démontré que les fibroblastes issus de tissus embryonnaires normaux peuvent atteindre jusqu'à 50 passages en culture avant de perdre tout pouvoir prolifératif. L'évolution des cellules en culture se divise en trois phases : mise en culture, croissance et dégénérescence (fig. 8). La phase de déclin de capacité de prolifération a été considérée comme étant une manifestation du vieillissement au niveau cellulaire. A confluence, les cellules de jeunes donneurs atteignent un nombre plus important que celles provenant d'explants de peau de personnes plus âgées (densité de saturation), révélant une augmentation de la surface des cellules. Un grand nombre de modifications biochimiques et génétiques apparaissent au cours du vieillissement *in vitro* et ces changements peuvent être corrélés avec le vieillissement *in vivo* (**Hayflick, 1977**).

Les études ont montré une relation inverse entre l'âge du donneur et le nombre de passages en culture *in vitro* (Tableau 1).

Les fibroblastes WI - 38 représentent un modèle de choix pour l'étude théorique et expérimentale du vieillissement. Le passage de ce type cellulaire par différents états stationnaires lors du vieillissement *in vitro* et *in vivo* a été décrit dans plusieurs articles.

**Bayreuther et al. (1988, 1989)** ont étudié des fibroblastes de lignées HH - 8 (fibroblastes dermiques humains) et des fibroblastes WI - 38 (fibroblastes de poumon foetal humain). Ces fibroblastes passent par 7 étapes (morphotypes) caractérisées par une biochimie et une morphologie définies. Nous avons confirmé ces résultats au laboratoire. Les morphotypes MF I, MF II, MF III sont mitotiques, les PMF IV, PMF V, PMF VI post-mitotiques et le PMF VII est un type dégénerescent.

Les MF I sont de petites cellules en forme de fuseau, les MF II apparaissent comme de grandes cellules épithéloïdes, les PMF VI ont une très grande surface et sont très pleiomorphes (fig.9). Lorsque ces morphotypes sont observés au cours des passages en culture, la population est hétérogène et les proportions en différents morphotypes varient en fonction des passages.

La proportion des MF I diminue au cours des subcultures pour atteindre une valeur nulle. Les MF II augmentent au début de la culture pour diminuer de manière

FETAL LUNG		ADULT LUNG		
Strain	Passage level at which Phase III occurred (population doublings)	Strain	Passage level at which Phase III occurred (population doublings)	Age of Donor
WI-1	51	WI-1000	29	87
WI-3	35	WI-1001	18	80
WI-11	57	WI-1002	21	69
WI-16	44	WI-1003	24	67
WI-18	53	WI-1004	22	61
WI-19	50	WI-1005	16	58
WI-23	55	WI-1006	14	58
WI-24	39	WI-1007	20	26
WI-25	41			
WI-26	50			
WI-27	41			
WI-38	48			
WI-44	63			
	Average 48		20	
	Range 35-63		14-29	

<sup>a</sup>All strains cultivated at a 1:2 split ratio. Fetal strains derived from donors of 3-4 months' gestation obtained by surgical abortion. Adult and fetal strains derived from both male and female tissue.

Tableau 1. Illustration de la relation entre le nombre de passages possibles en culture et l'âge du donneur. Les cellules issues des souches foetales WI - 1 à WI - 44 connaissent un nombre moyen de passages en culture maximum (avant apparition de la phase III) voisin de 48, alors que ce nombre est proche de 20 pour les souches issues d'individus adultes.



concomitante à l'apparition de plus en plus importante des MF III. Lors des passages en culture, la proportion des MF III diminue à son tour au profit des PMF IV. Les proportions des PMF V, VI, VII sont très faibles avec apparition des PMF V après le 30<sup>ème</sup> passage et les PMF VI après le 33<sup>ème</sup> passage (fig. 10).

#### 4.2. Influence des stress sur la proportion des morphotypes.

Ce modèle expérimental a été utilisé afin de tester l'effet de stress peu ou pas cytotoxiques sur l'évolution des divers types morphologiques cellulaires pour savoir si de telles fluctuations sont capables de provoquer une accélération du passage d'un état stationnaire à un autre. Les concentrations et les durées de stress furent choisies en fonction d'une toxicité limitée sur les cellules.

Les proportions des différents types morphologiques obtenues après le stress, ont été comparées à celles de la culture témoin de passage correspondant.

Les molécules stressantes, utilisées pour cette étude, étaient le tert-butylhydroperoxyde (TBHP) et l'éthanol. Avant d'expliquer les résultats obtenus, passons brièvement en revue les effets de l'éthanol et du TBHP sur les constituants cellulaires.

##### 4.2.1. Toxicité de l'éthanol.

L'éthanol agit au niveau de nombreuses fonctions cellulaires dans différents types cellulaires. Voici quelques exemples.

Etant un alcool à courte chaîne carbonée, l'éthanol possède la capacité de pénétrer dans la double couche lipidique des membranes cellulaires ce qui augmente leur fluidité. Pour les cellules cancéreuses, une relation directe entre l'augmentation de la fluidité membranaire par l'éthanol et la potentialité de la cellule à former des métastases a été mise en évidence (**Sibermen et al., 1990**). En tant que solvant organique, l'éthanol destabilise les membranes biologiques (**Brazeau et Fung, 1990; Stibler et al., 1991**). L'éthanol induit des variations dans la structure et l'organisation des phospholipides et de leurs acides gras et donc de la membrane plasmique.

Le syndrome foetal atteint 2 naissances sur 1 000 et touche 1/3 des enfants dont la mère a consommé plus de 150 gr d'alcool / jour durant la grossesse. Les symptômes sont liés à la taille et au développement du cerveau. Il semblerait que le mécanisme de la toxicité de l'éthanol serait une inhibition directe de la prolifération des cellules embryonnaires au début de la grossesse. Les travaux de **Barnes et al. (1990)** ont montré que l'éthanol



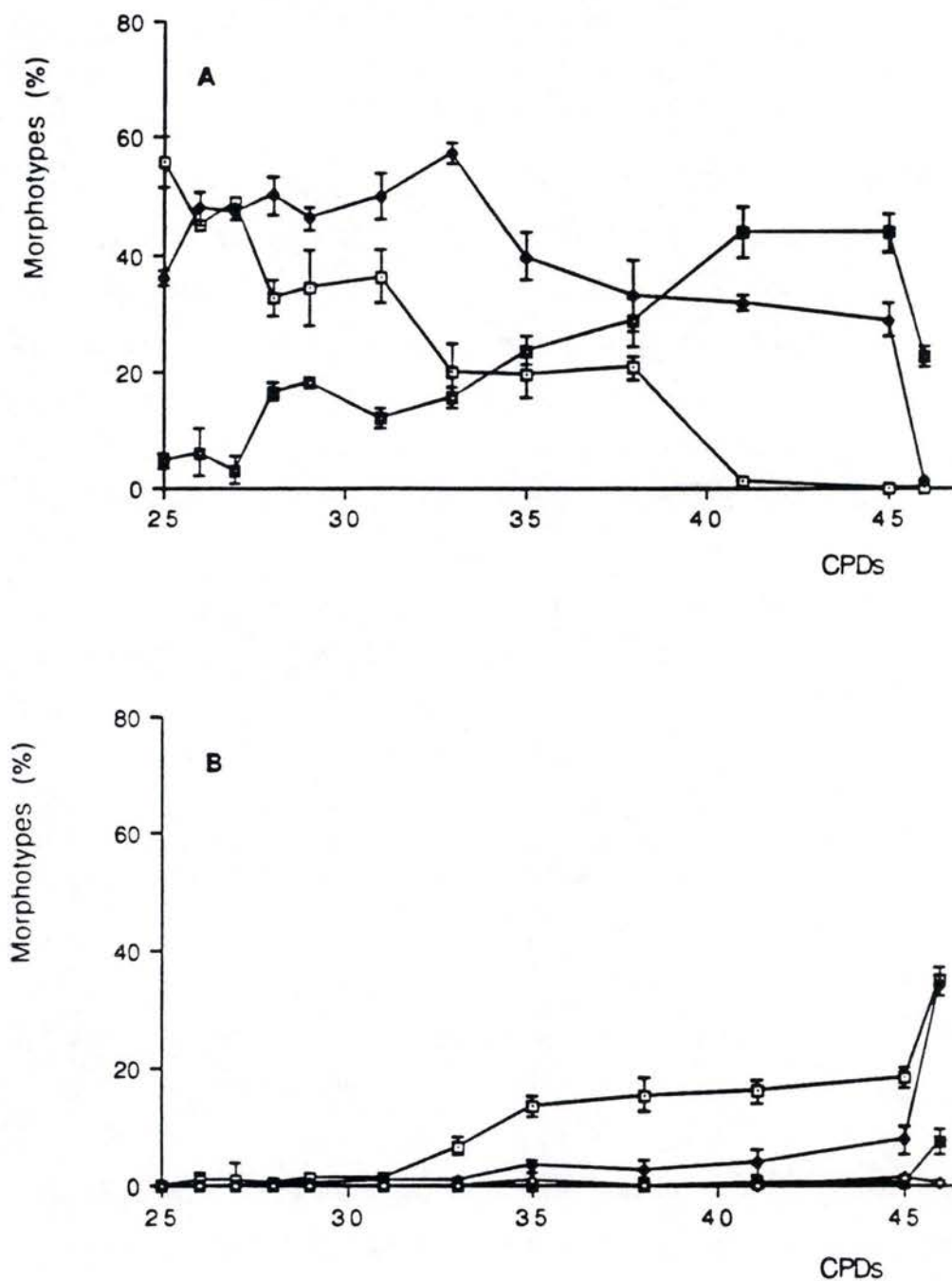


Figure 10. Proportions des morphotypes des fibroblastes WI-38 en fonction des passages (CPDs). **A.**: morphotypes mitotiques MF I ( $\square$ ), MF II ( $\blacktriangle$ ), MF III ( $\blacksquare$ ). **B.**: morphotypes post-mitotiques PMF IV ( $\square$ ), PMF V ( $\blacktriangle$ ), PMF VI ( $\blacksquare$ ), PMF VII ( $\diamond$ ).

Classical Haber - Weiss Reaction.



Modified Haber - Weiss Reaction ( Fenton Reaction).

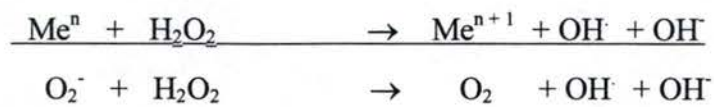


Figure 11. Réaction classique d'Haber - Weiss et modifiée par Fenton  
(d'après Fantone et Ward, 1982).

**A.**

		Durée du stress (min)					
		contrôle	20	30	40	60	75
Morpho							
types							
I	35,1±5,4	16,1±0,9	15,0±0,8	15,0±0,6	17,2±3,2	15,0±0,0	
II	47,9±2,8	42,5±5,4	49,7±4,8	58,1±5,1	44,7±6,0	50,2±4,2	
III	15,4±1,3	37,5±5,3	24,5±5,6	23,1±3,0	31,7±2,3	24,0±1,4	
IV	1,1±0,7	4,0±1,5	2,5±0,6	3,2±0,7	6,1±0,1	8,1±4,3	
V	0,6±0,5	0,5±0,3	0,7±0,1	0,5±0,8	0,4±0,1	3,1±0,8	
VI	0	0	0	0	0	0	
VII	0	0	0	0	0	0	

**B.**

		Intensité du stress				
		contrôle	éthanol 2% 1h 00	éthanol 2% 1h15	éthanol 4% 1h30	éthanol 4% 1h45
Morphotypes						
I	24,6±4,8	13,8±0,3	4,1±0,3	4,1±0,8	3,2±0,8	
II	50,9±1,7	41,9±0,1	47,9±1,5	33,4±1,0	24,5±3,4	
III	16,7±1,8	35,6±0,3	38,6±0,8	48,0±1,9	56,3±1,3	
IV	7,2±0,4	7,0±0,3	8,1±0,4	13,4±1,4	7,2±0,4	
V	1,5±0,5	1,6±0,3	1,3±0,6	1,7±0,5	0,2±0,3	
VI	0	0	0	0	0	
VII	0	0	0	0	0	

Figure 12 . Effet d'un stress unique sous TBHP  $10^{-4}$  M dilué dans du PBS pendant 20 min, 30 min, 40 min, 60 min et 75 min (A) ou sous éthanol 2 % dilué dans du PBS pendant 1 h, 1 h 15 min; 4 % pendant 1 h 30 min, 1 h 45 min (B), sur les proportions des différents morphotypes observés 5 jours après le stress en comparaison des contrôles. Les résultats sont donnés en pourcentages d'un morphotype donné dans les cultures contrôles et stressées.

Pour chaque stress, quatre échantillons comptant un minimum de 700 cellules ont servi à la détermination du pourcentage des morphotypes.



provoquerait une augmentation de la dégradation des protéines collagéniques et non collagéniques, ce qui contribue à une réduction nette de production en protéines.

Au niveau du muscle squelettique, les événements cruciaux de la contraction / relaxation sont initialement reliés aux phénomènes de capture et de rejet de calcium par le réticulum sarcoplasmique. L'éthanol (Ohnishi et al., 1984; Adickes, 1990) en augmente la perméabilité au calcium ( $\text{Ca}^{++}$ ). De telles modifications dans la conformation des canaux calciques seraient à l'origine des dysfonctionnements du muscle strié squelettique observés lors de l'intoxication à l'éthanol. Il provoque la formation de radicaux libres dans les hépatocytes (via le système de détoxification des cytochromes P 450).

#### 4.2.2. Toxicité du tert-butylhydroperoxyde ( TBHP ).

Le tert-butylhydroperoxyde est une molécule amphiphile qui pénètre aisément dans les cellules et mime l'effet toxique des acides gras peroxydés.

Des radicaux peroxydés sont générés dans le cytosol par l'interaction du TBHP avec le fer, participant ainsi à une réaction similaire à celle de Fenton (fig. 11).

Suite à la production de radicaux libres, des perturbations surviennent dans la cellule: augmentation de la perméabilité membranaire suite aux peroxydations lipidiques, élévation du calcium intracytoplasmique ayant comme conséquence l'activation d'enzymes différents (nucléases, phosphatases, kinases, protéases, ...), inhibition de la synthèse de l'ADN et de la mitose, ... (Yuan et al., 1991).

Le TBHP va également agir, indirectement, en inhibant la glutathion peroxydase et en oxydant du glutathion réduit (Flohe L., W. A. Gunzler, 1984).

#### 4.2.3. Effets de stress unique (Toussaint et al., 1992).

Les stress ont été effectués afin d'estimer d'un point de vue quantitatif l'impact de l'éthanol, du TBHP sur les proportions des différents morphotypes (TBHP  $10^{-4}$  M dilué dans du PBS pendant 20, 30, 40, 60, 75 minutes, l'éthanol dilué dans du PBS 2 % pendant 1 h.30, 1 h.45) (fig. 12). Les résultats donnent les pourcentages de chaque morphotype.

On remarque que la morphologie des cellules peuvent évoluer de différentes manières après un stress et qu'un morphotype peut donner naissance à un autre morphotype.

Après un stress, on remarque une évolution de cellules de morphotypes jeunes vers des

cellules de morphotypes âgés. Des résultats similaires ont été obtenus après stress sous U.V. ou sous mitomycine (Rodeman, 1989).

#### 4.2.4. Effets de stress successifs (Toussaint et al., 1992).

Des stress successifs peuvent être réalisés soit lors d'un même passage en culture, soit en réalisant un stress à chaque passage. Les résultats indiquent que la proportion de morphotypes jeunes est d'autant plus faible que le nombre de stress est élevé.

Des stress oxydatifs en présence de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ont aussi été effectués. Cette molécule est plus petite, plus hydrophile et possède une réactivité supérieure au tert-butylhydroperoxyde. Il faut donc une concentration plus faible en  $H_2O_2$  pour obtenir des résultats semblables à ceux observés après des stress au TBHP: on obtient des cellules dont la croissance est irréversiblement bloquée et qui présentent une morphologie de cellules âgées (Chen et Ames, 1994)

### 5. Rôle du métabolisme énergétique.

Le modèle théorique présenté plus haut prévoit aussi une diminution progressive de la production d'entropie parallèlement à une augmentation du niveau d'erreurs. Celle-ci a lieu lorsque la cellule passe par les différents états stationnaires, chacun d'eux ayant une production d'entropie caractéristique.

Le passage des fibroblastes d'un morphotype à un autre peut être considéré comme la réorganisation de l'activité cellulaire avec une nouvelle optimisation de l'utilisation de l'énergie libre en accord avec ses fonctions.

La cellule est capable d'adapter ses comportements en fonction de l'équilibre entre, d'un côté, son potentiel énergétique et le niveau des systèmes de défense et de l'autre, l'intensité de l'agression en concentration et en durée. Soumise à un stress, elle utilise une certaine quantité d'énergie de manière à pouvoir se défendre efficacement.

Pour produire cette énergie, elle peut soit: - puiser dans ses réserves,

- l'extraire de son environnement.

Donc, l'existence de molécules énergétiques dans le milieu de culture permet une défense accrue des fibroblastes face à un stress.

On observe, après un stress sous TBHP réalisé en présence de substrats énergétiques, une diminution de la vitesse de passage d'un morphotype à un autre. Face à des stress



plus intenses réalisés en utilisant des concentrations plus élevées en TBHP, on observe que la survie cellulaire, estimée par un dosage de protéines cellulaires un ou deux jours après le stress, est supérieure en présence de substrats énergétiques comme le D - glucose ou le pyruvate. Le L - glucose ne protège pas car, il est inutilisable par le métabolisme cellulaire, ni le phosphoénol pyruvate car ce dernier, bien qu'étant un intermédiaire du métabolisme énergétique, ne peut entrer dans les cellules ( Toussaint et al., 1994).

Grâce à ces preuves expérimentales, on constate que le niveau énergétique est un paramètre essentiel régulant la réaction de la cellule aux agressions.

## 6. Contrôle du relargage de calcium (au niveau mitochondrial).

Le calcium est un messager ionique quasi universel impliqué dans de très nombreux processus cellulaires. La concentration en  $\text{Ca}^{++}$  cytoplasmique dans les cellules au repos est 10 000 fois moins importante que dans le milieu extérieur; cela peut être attribué à une faible perméabilité de la membrane plasmique ainsi qu'à l'existence de pompes ioniques qui refoulent le  $\text{Ca}^{++}$ .

Lorsque les cellules sont mises en présence de molécules telles que le TBHP ou l'éthanol, la perméabilité de la membrane plasmique est modifiée permettant l'entrée de calcium. Parce que la concentration en  $\text{Ca}^{++}$  est élevée à l'extérieur de la cellule par rapport à l'intérieur, les cellules sont très sensibles à de faibles variations en calcium. Une accumulation excessive de  $\text{Ca}^{++}$  dans le cytoplasme peut conduire à un pompage de ce dernier par le réticulum endoplasmique puis par les mitochondries. Une accumulation trop importante de  $\text{Ca}^{++}$  dans les mitochondries peut déclencher une perméabilisation rapide de la membrane interne par ouverture d'un canal à haute conductance, amenant la désenergisation des mitochondries avec arrêt de la production d'ATP et dissipation de gradients d'ions et de métaboliques.

Lors d'une augmentation faible de la concentration en  $\text{Ca}^{++}$  intracytoplasmique, du  $\text{Ca}^{++}$  entre dans les mitochondries (antiport  $\text{Ca}^{++} / \text{H}^+$ , uniport) et le relargage de  $\text{Ca}^{++}$  dans le cytoplasme se fera lentement par la suite, entraînant une stabilisation progressive de la concentration en  $\text{Ca}^{++}$  intracytoplasmique.



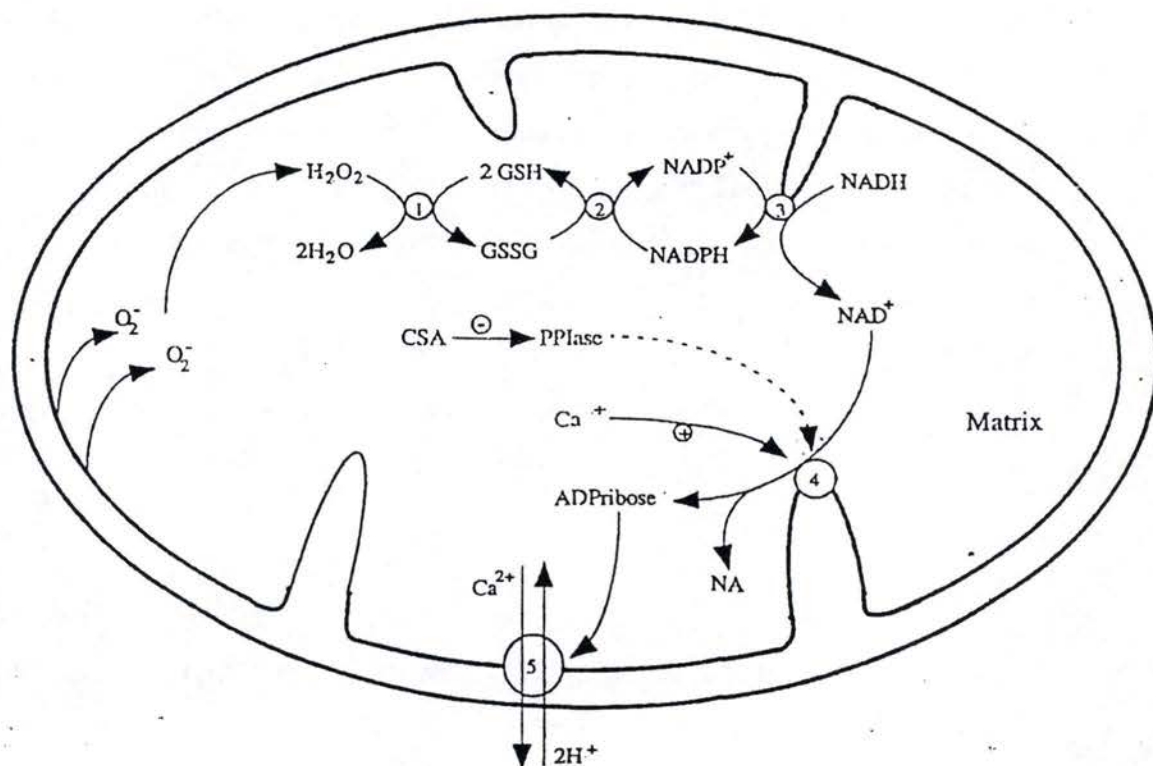


Figure 13. Illustration de l'hypothèse de C. Richter (1996)

- 1 . Glutathione peroxydase.
- 2 . Glutathione réductase.
- 3 . Transhydrogenase.
- 4 .  $\text{NAD}^+$  glycohydrolase
- 5 . Antiport ( $\text{Ca}^{2+} 2\text{H}^+$ )

Le mécanisme d'action se trouve expliqué en détail dans le texte.

Lorsqu'un relargage lent de  $\text{Ca}^{++}$  (antiport  $\text{Ca}^{++} / 3\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++} \text{ nH}^+$ ) ne suffit pas pour faire diminuer la concentration en  $\text{Ca}^{++}$  intra-mitochondriale, la concentration en calcium augmente alors dangereusement dans les mitochondries.

Deux écoles s'affrontent quant au mécanisme d'action de ce phénomène. Elles sont stigmatisées par deux laboratoires: celui du Professeur **P. Bernardi (Padoue, Italie)** et celui de Professeur **C. Richter (Zurich, Suisse) (1996)**.

#### Hypothèses.

Les anions superoxydes produits par la chaîne respiratoire mitochondriale vont être convertis en  $\text{H}_2\text{O}_2$  (action de la superoxyde dismutase). Le peroxyde d'hydrogène sera, quant à lui, transformé en  $\text{H}_2\text{O}$  grâce à la glutathion peroxydase; cette réaction nécessite la présence de glutathion (GSH). La régénération de GSH est réalisée par l'action de la transhydrogénase transformant NADPH en  $\text{NAD}^+$ .

Selon **C. Richter**, il existe un mécanisme par lequel le  $\text{Ca}^{++}$  serait relargué brutalement des mitochondries vers le cytoplasme. Richter précise qu'une molécule comme la Cyclosporine A est capable d'inhiber ce relargage brutal en se « liant » à la peptidyl - propyl cis - trans isomérase (une cyclophiline matricielle). L'action de cette cyclophiline est de se lier à la  $\text{NAD}^+$  glycohydrolase (enzyme de la membrane interne des mitochondries) et le  $\text{Ca}^{++}$  présent dans la matrice activerait l'hydrolyse du  $\text{NAD}^+$  en ADP ribose et en nicotinamide. L'ADP ribose active l'antiport ( $\text{Ca}^{++} / 2 \text{H}^+$ ) responsable du relargage de  $\text{Ca}^{++}$  (fig. 13).

Pour **P. Bernardi**, l'entrée de  $\text{Ca}^{++}$  dans les mitochondries fait chuter leur potentiel de membrane interne provoquant la formation de pores. La cyclophiline matricielle se lierait aux pores et provoquerait l'ouverture au passage de molécules présentant un poids moléculaire supérieur à 1 500 Da.

La cyclosporine A, se liant à la cyclophiline, l'empêche de se lier aux pores, ce qui inhibe l'ouverture.

## II. Objectifs.

Dans l'introduction de ce mémoire, nous avons décrit un modèle théorique de vieillissement des fibroblastes humains et avons donné les principaux arguments en faveur de ce modèle.

Le but de ce travail était de tester certaines prévisions de ce modèle: premièrement que la résistance des cellules à des stress létaux ou non est modulée par le niveau du métabolisme énergétique et par les systèmes de défense et deuxièmement que les cellules âgées possèdent un métabolisme énergétique moins intense que celui des cellules jeunes, ce qui pourrait avoir une influence sur la résistance aux stress des cellules âgées.

Afin d'atteindre ce but, nous essaierons, dans un premier temps, de mettre en évidence l'importance du métabolisme énergétique et des systèmes de défenses d'une part sur la survie des fibroblastes WI - 38 lors de stress létaux et d'autre part, sur la résistance des fibroblastes WI - 38 au passage accéléré par leurs divers morphotypes.

Dans un deuxième temps, nous tenterons de déterminer les paramètres mitochondriaux du vieillissement en mesurant la consommation d'oxygène d'une suspension cellulaire dont les membranes plasmiques ont été préalablement perméabilisées.



### III. Matériels et méthodes.

#### 1. Culture de fibroblastes.

##### 1.1. Matériels.

Les fibroblastes WI - 38 utilisés dans le cadre de ce travail sont des cellules embryonnaires de poumon humain (American Type Culture Collection, U.S.A). Ces cellules ont été mises en culture selon la procédure classique décrite par Hayflick (1965).

- BME : Milieu basal de Eagle contenant des sels de Earle, 13 acides aminés essentiels et non essentiels, 8 vitamines (Gibco, Grande - Bretagne).
- BME + SB 10 % : Milieu BME additionné de 10 % de sérum de veau foetal (PAA Laboratories, Autriche).
- Trypsine : Solution stérile de trypsine à 0,25 % dans un tampon composé de 0,4 g / l KCl ; 2,2 g / l NaHCO<sub>3</sub> ; 6,8 g / l NaCl ; 1 g / l glucose et 0,0005 g / l rouge de phénol (Gibco, Grande - Bretagne).
- BME + DMSO 10 % : Dimethylsulfoxyde (Acros Chimica, Belgique) dilué à une concentration de 10 % dans du BME. Le DMSO est utilisé comme cryoprotecteur lors de la congélation des cellules.
- Milieu de rinçage : BME.
- Plaque multi-puits : Stériles et de 24 cupules de 24 cm<sup>2</sup> (Corning, U.S.A.).
- Boîtes de Culture : Stériles et de 75 cm<sup>2</sup> ( Corning, U.S.A.).

Les solutions de trypsine et le sérum de veau foetal sont conservés à - 20° C et les autres milieux à 4°C. Tous sont réchauffés à 37°C avant chaque utilisation.

## 1.2. Méthodes.

### 1.2.1. Repiquage des cellules.

Les cellules sont cultivées selon la méthode décrite par **Hayflick (1965)** dans des boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup>. Lorsqu'elles arrivent à confluence, ce qui représente une densité moyenne de 8. 10<sup>4</sup> cellules par cm<sup>2</sup>, les cellules sont repiquées dans des conditions stériles. Pour ce faire, elles sont rincées dans 10 ml de milieu de rinçage afin d'éliminer toute trace de sérum, celui-ci contenant des inhibiteurs de protéases. Ensuite, les cellules sont incubées à température ambiante avec 2 ml de trypsine jusqu'à ce que l'on observe l'arrondissement et le début du détachement cellulaire au microscope à contraste de phase, c'est-à-dire pendant environ 2 min. La trypsine est alors décantée, la boîte est placée dans une étuve à 37°C pendant une dizaine de min. afin d'accélérer le processus de détachement cellulaire. On ajoute ensuite 10 ml BME + SB 10 %, le sérum inactivant la trypsine. A l'aide d'une pipette pasteur, on rompt les agrégats cellulaires. Les cellules sont ainsi resuspendues dans 10 ml BME + SB 10 %. A ce stade, un comptage peut être réalisé en prélevant 2 gouttes de la suspension cellulaire et en les déposant dans une chambre de Neubauer (Vel, Belgique).

Pour terminer, on répartit cette suspension cellulaire dans 2 (ou 4) boîtes de 75 cm<sup>2</sup> et on porte le volume de chacune d'elles à 20 ml BME + SB 10 %. La suspension cellulaire peut être également transférée dans des boîtes de culture de 25 cm<sup>2</sup>, ou dans des boîtes multi-puits (à une densité estimée par comptage cellulaire à l'aide de la chambre de Neubauer) selon le type d'expérience que l'on souhaite réaliser.

On ajuste le pH du milieu des boîtes de culture en ajoutant un mélange gazeux contenant 5 % de CO<sub>2</sub> et 95 % d'air. Quant aux boîtes multi-puits, elles sont placées dans une étuve à 37°C contenant 5 % de CO<sub>2</sub>, jusqu'au lendemain (jour d'utilisation des cellules).

### 1.2.2. Congélation des cellules.

Les cellules sont rincées et trypsinisées suivant la méthode décrite ci-dessus. Après centrifugation pendant 10 min. à 1.000 rpm (Hettich Universal, Allemagne), on resuspend le culot ainsi obtenu dans 0,4 ml BME + SB 40 %. On place ensuite ce milieu contenant les cellules dans une ampoule stérile (Nunc, Danemark). Juste avant la congélation, on ajoute 0,4 ml BME + DMSO 10 %.



La congélation est réalisée grâce à un appareil programmable (L'Air Liquide, Belgique) pour diminuer la température de 1°C par minute. L'ampoule contenant les cellules est alors stockée dans l'azote liquide à - 196°C.

La congélation peut également être réalisée en plaçant l'ampoule dans un tube de 50 ml vide et hermétiquement fermé que l'on plonge dans un récipient contenant de l'alcool - éther, ce qui ralentit la congélation des cellules lorsqu'on les met à - 70°C. Après congélation, l'ampoule peut ensuite être transférée à - 196°C dans l'azote liquide.

### 1.2.3. Décongélation des cellules.

L'ampoule de cellules stockée dans l'azote liquide est immédiatement plongée dans un bain à 40°C. Après décongélation (étape rapide devant se dérouler en moins d'1 minute), les cellules sont centrifugées pendant 10 minutes à 1.000 rpm (Hettich Universal, Allemagne). Le surnageant est éliminé tandis que le culot est resuspendu dans du BME + SB 10 % avant d'être transféré dans une boîte de culture.

Le lendemain, il est nécessaire de changer le milieu afin d'éliminer toute trace de DMSO, toxique pour les cellules.

## 2. Test de cytotoxicité.

### 2.1. Etude de l'effet cytotoxique de stress cellulaires.

#### 2.1.1. Matériels.

- PBS : « Phosphate Buffer Saline », tampon phosphate 10 mM contenant 0,9 % de NaCl et à pH 7,4.
- Ethanol absolu : (Merck , Allemagne).
- Tert - butylhydroperoxyde : (Merck , Allemagne).  
(TBHP)
- Plaques multi - puits : Stériles et de 24 cupules de 2 cm<sup>2</sup> (Corning, U.S.A.).
- BME + SB 10 % : Milieu BME additionné de 10 % de sérum de veau foetal (PAA Laboratories, Autriche).



### 2.1.2. Méthodes.

Les cellules sont repiquées avec du BME + S dans des plaques multi-puits de 24 cupules.

Lorsque les cellules atteignent la confluence d'environ 100.000 cellules / 2 cm<sup>2</sup>, elles sont soumises à différentes concentrations en tert-butylhydroperoxyde diluées dans du PBS (10<sup>-5</sup> M, 5.10<sup>-5</sup> M, 10<sup>-4</sup> M, 5.10<sup>-4</sup> M, 10<sup>-3</sup> M) durant une heure ou à différentes concentrations en éthanol diluées également dans du PBS (1,5 %, 3 %, 4,5 %, 6 %, 7,5 %) durant 2 heures.

Après le stress, les cellules seront rincées deux fois à l'aide de 1 ml de PBS et 1 ml de milieu frais additionné de 10 % de sérum de veau foetal est ajouté dans chaque puits.

Pour chaque type d'expériences, nous réalisons des quadruples.

## 2.2. Mesure de la toxicité par dosage de protéines.

### 2.2.1. Matériels.

- Solution d'étalon protéine (albumine de sérum bovin ) à 200 µg / ml (Sigma, U.S.A.).
- NaOH 0,5N et 1 N (Merck, Allemagne).
- Mixture alcaline à préparer juste avant l'emploi:
  - 100 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,19 M (Merck, Allemagne).
  - 1 ml CuSO<sub>4</sub> . 5.H<sub>2</sub>O 0,04 M (Merck, Allemagne).
  - 1 ml NaKC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> . 1 H<sub>2</sub>O 0,07 M (Merck, Allemagne).
- Réactif de Folin-Ciocalteu du phénol à diluer deux fois avant utilisation (Sigma, U.S.A.).

### 2.2.2. Méthodes.

Deux jours après le stress, les protéines cellulaires seront dosées par la méthode de **Lowry et al. (1951)**. Les protéines sont dénaturées par le NaOH et exposent de cette façon leurs groupements aux réactifs. Les ions cuivriques de la solution alcaline utilisée pour le dosage forment un complexe bleu avec les liaisons peptidiques, tandis que le complexe phosphomolybdique-phosphotungstique du réactif de Folin est réduit par les résidus tyrosine et tryptophane des protéines. L'intensité de la coloration bleue est

mesurée à 660 nm au spectrophotomètre (Uvikon 940, Kontron Instruments, Italie) et est proportionnelle à la quantité de protéines présentes.

Les cellules sont rincées une fois avec du PBS. Les protéines sont dénaturées en ajoutant 0,5 ml de NaOH 0,5 N pendant 30 minutes. Parallèlement, on prépare le blanc et l'étalon:

- blanc : 0,2 ml d'eau + 0,2 ml de NaOH 1 N pendant 30 minutes
- étalon : 0,2 ml d'étalon + 0,2 ml de NaOH 1 N pendant 30 minutes.

Les protéines cellulaires sont resuspendues et des fractions de 0,2 ml sont récoltées. Le blanc et l'étalon sont gardés tels quels.

Ces fractions peuvent soit être :

- dosées directement,
- congelées à -20°C pour un dosage ultérieur.

Les fractions de protéines cellulaires, le blanc et l'étalon sont décongelés. Pour tous les tubes, toutes les 30 secondes, 2 ml de mixture alcaline sont ajoutés. Celle-ci doit réagir pendant 5 à 15 minutes. Les tubes sont vigoureusement et directement mélangés. Ensuite, 0,2 ml de réactif de Folin sont ajoutés en respectant le temps et l'ordre des tubes puis immédiatement secoués. La densité optique (DO) à 660 nm est lue au spectrophotomètre après 30 minutes.

La concentration en protéines se calcule comme suit:

$$\text{Concentration en } \mu\text{g / ml} = 200 \times \frac{(\text{DO échantillon} - \text{DO blanc})}{(\text{DO étalon} - \text{DO blanc})} \times \text{dilution}$$

## 2.3. Effet de la composition du milieu utilisé lors d'un stress.

### 2.3.1. Matériels.

- PBS : « Phosphate Buffer Saline », tampon phosphate 10 mM contenant 0,9 % de NaCl, pH 7,4.
- Ethanol absolu : (Merck, Allemagne).
- TBHP : (Merck, Allemagne).
- Plaques multi-puits : Stériles et de 24 cupules de 2 cm<sup>2</sup> (Corning, U.S.A.)
- D - glucose : (Merck, Allemagne).
- N - Acétyl - L - Cystéine : (Sigma, U.S.A.).
- Acétate de d -  $\alpha$  - tocophérol : (Sigma, U.S.A.).  
(vitamine E)
- Cyclosporine A : (fournie gracieusement par le professeur Richter, Zurich).

### 2.3.2. Méthodes.

Les fibroblastes sont repiqués dans des plaques multi-puits à 100.000 cellules / 2 cm<sup>2</sup>. Ensuite, ils sont soumis à des stress sous TBHP durant 1 heure ou sous éthanol durant 2 heures; différentes concentrations sont diluées dans divers milieux:

Concentration	Milieux
TBHP (10 <sup>-5</sup> M, 5.10 <sup>-5</sup> M, 10 <sup>-4</sup> M, 5.10 <sup>-4</sup> M, 10 <sup>-3</sup> M)	- PBS - PBS + D - glucose 5 mM - PBS + N - Acétyl - L - Cystéine 5 mM - PBS + vitamine E 10 <sup>-3</sup> M - PBS + cyclosporine A 5 $\mu$ M



Concentration	Milieux
Ethanol (1,5 %, 3 %, 4,5 %, 6 %, 7,5 %)	- PBS - PBS + D - glucose 5 mM - PBS + N - Acétyl - L - Cystéine 5 mM - PBS + vitamine E $10^{-3}$ M - PBS + cyclosporine A 5 $\mu$ M

La vitamine E est tout d'abord dissoute dans de l'éthanol absolu, les dilutions suivantes se feront dans du PBS.

Pour les cellules subissant un stress dans des milieux contenant de la vitamine E et du N - Acétyl - L - Cystéine, il est indispensable de les pré-incuber pendant 24 heures dans du BME + SB 10 % + vitamine E ou BME + SB 10 % + N - Acétyl - L - Cystéine.

Deux jours après le stress, les cellules seront rincées une fois au PBS et les protéines cellulaires seront dosées par la méthode de Folin - Ciocalteu décrite ci-dessus.

N.B : L'expérience fut réalisée quatre fois afin d'obtenir des répétitions.

### 3. Stress cellulaires et morphotypes.

#### 3.1. Détermination des types morphologiques.

##### 3.1.1. Matériels.

- Boîtes de Pétri : stériles et de 6 cm de diamètre (Falcon, U.S.A.) .
- PBS : tampon phosphate 10 mM additionné de NaCl 0,9 %, pH 7,4
- Ethanol 70 % : (Merck, Allemagne).
- Solution de fixation : paraformaldéhyde (Merck, Allemagne) à 3,7 % dans du PBS (bouillir pour dissoudre sous une hotte).
- Solution de coloration : Bleu de Coomassie - 50 mg de colorant (Janssen Biochimica, Belgique) dilué dans 4,7 ml d'acide acétique (Janssen Biochimica, Belgique)
  - 22,7 ml d'éthanol absolu.
  - 22,7 ml H<sub>2</sub>O distillée.

### 3.1.2. Méthodes.

Dans le but de déterminer les différents types morphologiques des fibroblastes, ceux-ci sont repiqués à faible densité dans des boîtes de Pétri préalablement quadrillées (environ 15 000 cellules / boîte).

Deux jours après le repiquage, ils sont d'abord rincés 2 fois au PBS et ensuite fixés dans une solution de paraformaldéhyde 3,7 % / PBS durant 10 minutes.

La solution de fixation est alors décantée et on y ajoute de l'éthanol 70 % durant 10 minutes. Après une nouvelle décantation, les boîtes sont séchées dans une étuve à 37°C.

La coloration cellulaire peut alors avoir lieu, elle est réalisée au Bleu de Coomassie durant 30 secondes. On rince ensuite les boîtes à l'eau distillée et on les laisse sécher à 37°C.

Le comptage des types morphologiques est réalisé au microscope à contraste de phase sur les quatre répliquats réalisés lors de l'expérience.

## 3.2. Stress successifs.

### 3.2.1. Matériels.

- PBS : « Phosphate Buffer Saline », tampon phosphate 10 mM contenant 0,9 % NaCl, pH 7,4.
- Ethanol absolu : (Merck, Allemagne).
- Tert-butylhydroperoxyde : (Merck, Allemagne).
- Plaques multi-puits : Stériles, 24 cupules de 2 cm<sup>2</sup> (Corning, U.S.A).
- BME + SB 10 % : Milieu additionné de 10 % de sérum de veau foetal (PAA Laboratories, Autriche).

### 3.2.2. Méthodes.

Les cellules sont repiquées dans des plaques multi-puits à 100.000 cellules / 2 cm<sup>2</sup>; des répliquats seront réalisés.

Ensuite, elles sont soumises à 5 stress successifs:

- sous éthanol 4,5 % dilué dans du PBS durant 2 heures, à raison d'un stress tous les deux jours.
- sous TBHP  $2,5 \cdot 10^{-5}$  M dilué dans du PBS durant 1 heure, à raison d'un stress par jour.

Au terme de chaque stress, les puits sont rincés avec du milieu BME et du milieu de culture frais contenant 10 % de sérum bovin est fourni aux cellules.

### 3.3. Effets de la composition du milieu utilisé lors de stress.

#### 3.3.1. Matériels.

- PBS : « Phosphate Buffer Saline », tampon phosphate 10 mM contenant 0,9 % de NaCl de pH 7,4.
- TBHP : (Merck, Allemagne).
- Ethanol absolu : (Merck, Allemagne).
- D - glucose : (Merck, Allemagne).
- Acétate de d-  $\alpha$  - tocophérol : (Sigma, U.S.A.).  
(vitamine E)

#### 3.3.2. Méthodes.

Nous avons repris le modèle de 5 stress d'1 heure sous TBHP  $2,5 \cdot 10^{-5}$  M ou de 2 heures sous éthanol 4,5 % dilué dans PBS (cf.3.2.2).

Ce PBS a été additionné soit de D - glucose 5 mM, soit de vitamine E  $10^{-3}$  M.

Après chaque stress, les cellules sont rincées avec du BME et remises en présence de BME + S ou BME + S + vitamine E  $10^{-3}$  M (dans le cas de stress en présence de vitamine E). Pour les stress en présence de vitamine E, il est nécessaire de préincuber les cellules 24 heures avant le 1<sup>er</sup> stress dans du BME + S + vitamine E ( $10^{-3}$  M).

### 3.4. Détermination de l'effet de stress multiples et de la composition du milieu de stress sur le vieillissement accéléré par le test de la $\beta$ - galactosidase.

#### 3.4.1. Matériels.

- Boîtes de Pétri : Stériles, de 6 cm de diamètre (Falcon, U.S.A.) .
- PBS : Tampon phosphate 10 mM contenant 0,9 % NaCl, pH 7,4.
- Méthanol : (Sds, France).



- Solution de fixation : 2 % formaldéhyde (Belgolabo, Belgique) + 0,2 % glutaraldéhyde (Fluka, Switzerland) dilués dans du PBS.
- Solution de coloration : - 4 ml d'une solution d'acide citrique dans un tampon phosphate. On réalise cette solution:
  - 36,85 ml de monohydrate d'acide citrique 0,1 M (Merck, Allemagne) + 63,15 ml de solution de phosphate de sodium 0,2 M.

Remarque:

le pH de la solution doit être impérativement de 6,0.

- 1 ml de ferrocyanide de potassium 100 mM (UCB, Belgique)
- 1 ml de ferrocyanide de potassium 100 mM (UCB, Belgique)
- 0,6 ml de NaCl 5 M (Merck, Allemagne).
- 40 µl de MgCl<sub>2</sub> 1 M (Merck, Allemagne).
- 13,4 ml d'eau distillée
- 1 ml de 5 - Bromo - 4 - chloro - 3 - indolyl β - D - galactopyranoside (Sigma, U.S.A.) dilué dans du diméthylformamide 20 mg / ml (Janssen, Belgique).

### 3.4.2. Méthodes.

Le principe de cette expérience est la détection d'une activité de la β - galactosidase présente spécifiquement dans le cytoplasme des cellules sénescents à pH 6,0 (CSA - β - gal : senescence associated β - galactosidase) (Dimri et al., 1995).

Le test réalisé colore en bleu l'espace situé autour du noyau des cellules exprimant la β - galactosidase.

Lors du repiquage (avant le stress) dans les plaques multi-puits, une partie des cellules destinées au stress sont repiquées dans une boîte de Pétri préalablement quadrillée à une densité de 15 000 cellules / 2 cm<sup>2</sup>.

Ces cellules témoins ne subiront pas de stress et seront fixées et colorées le lendemain selon la méthode décrite ci-dessous.

5 stress successifs sont réalisés comme expliqués ci-dessus et des réplicats seront également effectués.

24 heures après le 5<sup>ème</sup> stress, les cellules provenant des multi-puits sont repiquées dans des boîtes de Pétri préalablement quadrillées (15 000 cellules / 2 cm<sup>2</sup>).

Le lendemain, les boîtes sont rincées deux fois au PBS avant d'être fixées durant 10 minutes à température ambiante (2 ml de solution de fixation par puits).

Les cellules sont de nouveau rincées 2 fois au PBS avant d'être colorées, cette fois, à l'aide de 2 ml de solution de coloration par puits, et incubées de 12 à 16 heures dans l'étuve à 37°C sans CO<sub>2</sub>.

On fait ensuite 2 lavages au PBS, 2 lavages au méthanol et on laisse sécher les boîtes de Pétri à l'air libre.

Le comptage des cellules colorées et non colorées est réalisé au microscope à contraste de phase

## 4. Etude de la respiration au cours du vieillissement.

### 4.1. Mesure de la consommation d'oxygène.

#### 4.1.1. Matériels.

- Milieu de resuspension : 100 ml, pH 7,4.
  - Saccharose 4,2788 gr 125 mM (Tirlemont, Belgique).
  - KCl 0,48466 gr 65 mM (Merck, Allemagne).
  - Tris - HCl 0,1211 gr 10 mM (Merck, Allemagne).
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0340 gr 2,5 mM (Merck, Allemagne).
  - MgCl<sub>2</sub> 0,0203 gr 1 mM (Merck, Allemagne).
  - EGTA 0,0126 gr 0,33 mM (Sigma, U.S.A).
- BME : Milieu basal de Eagle contenant les sels de Earle, 13 acides aminés, 8 vitamines (Gibco, Grande - Bretagne).
- BME + SB 10 % : Milieu BME additionné de 10 % de sérum de veau foetal (PAA Laboraties, Autriche).
- Trypsine : Solution stérile de trypsine à 0,25 % dans un tampon composé de 0,4 g /l KCl, 2,2 g /l NaHCO<sub>3</sub>, 6,8 g /l NaCl, 1 g /l glucose et 0,0005 g /l rouge de phénol (Gibco, Grande - Bretagne).



- Boîtes de culture : Stériles, 75 cm<sup>2</sup> (Corning, U.S.A.).
- Tubes stériles en plastique : (Stérilin, Grande - Bretagne).
- Digitonine : (Merck, Allemagne).
- Adénosine-5'-disphosphate: Monopotassium salt crystals (Boehringer, Allemagne).
- Acide succinique : Disodium salt (Sigma, U.S.A.).
- Oligomycine : (Sigma, U.S.A.).
- Carbonyl cyanide - m - chlorophénylhydrazone : m - CCCP (Sigma, U.S.A.).

#### 4.1.2. Méthodes.

Les fibroblastes sont repiqués dans des boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup>. La subconfluence atteinte, les cellules sont rincées et soumises à l'action de la trypsine jusqu'à observation de l'arrondissement et de début du détachement cellulaire au microscope de phase (plus ou moins 2 minutes).

La solution de trypsine est décantée et les boîtes sont posées dans l'étuve à 37°C durant environ 10 minutes. On ajoute alors 5 ml de BME + SB 10 % par boîte. Les agrégats cellulaires sont rompus à l'aide d'une pipette pasteur.

On dénombre les cellules des différentes boîtes en les disposant dans une chambre de Neubauer (Vel, Belgique). Le nombre total requis pour l'expérience est de 10 millions. Les 10<sup>7</sup> cellules sont placées dans des tubes en plastique de 10 ml et centrifugées à 1 000 rpm (centrifugeuse Hettich Universal, Allemagne).

On resuspend le culot dans 1,6 ml de milieu de resuspension (préalablement réchauffé à 37°C) et placé dans la cellule d'incubation thermostatée à 37°C de l'oxypolarigraphe (K - IC Oxygraph) (Gilson, U.S.A.).

L'élément central de l'oxypolarigraphe est constitué d'une *Electrode de Clarck* possédant une cathode centrale en or ou en platine et une anode en argent.

Les électrodes sont séparées de la solution par une fine membrane de polytétrafluoroéthylène (matière plastique perméable aux gaz, imperméable aux électrolytes et aux autres solutés non - gazeux) et sont raccordées à un dispositif électrique; le courant est mesuré au moyen d'un millivoltmètre enregistreur.

Pratiquement, l'*électrode de Clarck* mesure en fait un courant électrique dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en oxygène de la solution.



Lorsque les fibroblastes sont dans la cellule d'incubation, un barreau magnétique homogénise la solution.

Divers essais seront effectués avec différentes concentrations finales en digitonine afin d'obtenir un optimum au niveau perméabilisation de membranes.

Seront ajoutés successivement: - de l'acide succinique 5 mM durant 4 minutes,

- de l'ADP 2 mM durant 3 minutes,

- de l'oligomycine 2 µg /ml,

- du m - CCCP 0,2 µM.

L'enregistrement de la consommation d'oxygène en fonction du temps se réalise sur papier millimétré.

N.B: Le calibrage de l'appareil à 100 % d'oxygène se fait à l'aide d'un nombre important de levures placées dans la cellule d'incubation. Le 0 % étant obtenu quand les levures ont consommé tout l'oxygène.

Les fibroblastes utilisés proviennent de culture à différents passages en culture afin de pouvoir effectuer des comparaisons entre cellules jeunes et vieilles.

## 4.2. Effets d'un agent découplant sur la chaîne respiratoire.

### 4.2.1. Matériels.

- Boîtes de culture : Stériles, 7,5 cm<sup>2</sup> (Corning, U.S.A.).
- Milieu de resuspension : 100 ml, pH 7,4.
  - Saccharose 4,2788 gr 125 mM (Tirlemont, Belgique).
  - KCl 0,48466 gr 65 mM (Merck, Allemagne).
  - Tris - HCl 0,1211 gr 10 mM (Merck, Allemagne).
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0340 gr 2,5 mM (Merck, Allemagne).
  - MgCl<sub>2</sub> 0,0203 gr 1 mM (Merck, Allemagne).
  - EGTA 0,0126 gr 0,33mM (Merck, Allemagne).
- BME + SB 10 % : Milieu BME additionné de 10 % de sérum de veau foetal (PAA Laboratories, Autriche).
- Milieu de rinçage : BME.
- Trypsine : Solution stérile de trypsine à 0,25 % dans un tampon de 0,4 g / l KCl ; 2,2 g / l NaHCO<sub>3</sub>. 6,8 g / l NaCl ; 1 g/l

glucose et 0,0005 g /l rouge de phénol (Gibco,  
Grande - Bretagne).

- Carbonyle cyanide - m - chlorophénylhydrazone : m - CCCP (Sigma, U.S.A.).

#### 4.2.2. Méthodes.

La confluence atteinte, les cellules repiquées dans des boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup> sont rincées et on ajoute durant 30 minutes 10 ml de BME + SB 10 % + m - CCCP (concentration 50 µM finale).

Ensuite, le milieu est décanté, de la trypsine est ajoutée durant 2 minutes jusqu'au commencement du détachement cellulaire et placée 10 minutes à l'étuve 37°C.

Les fibroblastes sont recueillis, centrifugés, resuspendus dans 1,6 ml de milieu de resuspension.

On place les cellules dans la cuvette d'incubation de l'oxypolarigraphe (K - IC Oxygraph) (Gilson, U.S.A.).

La consommation d'O<sub>2</sub> doit augmenter de manière très importante en présence de découplants, ce qui est la preuve de la possibilité de l'existence d'un métabolisme de phosphorylations oxydatives, sans toutefois en déterminer l'importance. De telles expériences contrôles sont réalisées lorsque les cellules perméabilisées ne montrent pas de consommation d'oxygène moléculaire.

#### 4.3. Mesure de l'osmolarité du milieu de resuspension.

##### 4.3.1. Matériels.

- Digitonine: (Merck, Allemagne).
- Solution de correction : KCl (1.000 milliosmoles / kg)  
4,33 g de KCl (Merck, Allemagne) + 100 ml H<sub>2</sub>O.
- Milieu de resuspension : 100 ml, pH 7,4.  
Saccharose 4,2788 gr 125 mM (Tirlemont, Belgique).  
KCl 0,4866 gr 65 mM (Merck, Allemagne).  
Tris - HCl 0,1211 gr 10 mM (Merck, Allemagne).  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0340 gr 2,5 mM (Merck, Allemagne).  
MgCl<sub>2</sub> 0,0203 gr 1 mM (Merck, Allemagne).  
EGTA 0,0126 gr 0,33 mM (Merck, Allemagne).

#### 4.3.2.. Méthodes.

Les  $10^7$  cellules sont recueillies, resuspendues dans 1,6 ml de milieu de resuspension. Elles sont placées dans une cuvette et l'osmolarité du milieu est déterminée à l'aide d'un osmomètre (Advanced Instruments, inc., U.S.A.).

Principe: - mesure de l'osmolarité (mosm./ kg) en fonction du point de congélation (température pour laquelle l'état solide coexiste avec l'état liquide),  
- plus la température de congélation est basse, plus la concentration en solutés est important et plus l'osmolarité augmente (1 milliosmole = 1,858 millidegrés C).

L'appareil est calibré à l'aide de solution d'étalonnage d'osmolarité de 100 et de 900 mosm./ kg.

Afin de connaître la modulation de l'osmolarité par un composé tel que la digitaline, différentes concentrations de celle-ci seront ajoutées au milieu de resuspension: 20  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 120  $\mu$ M, 130  $\mu$ M, 140  $\mu$ M (concentrations finales).

Dans un deuxième temps, l'osmolarité trop basse du milieu de resuspension sera corrigée à l'aide d'une solution KCl.

Formule: Y = volume de solution KCl à ajouter / ml de solution mesurée

$$\begin{aligned} & 330 - \text{osmolarité mesurée du milieu} \\ & = \frac{\quad}{1\ 000 - 330} \end{aligned}$$

Après correction, on répète l'opération précédente: ajout des mêmes concentrations finales en digitonine.



## 5. Tests de survie cellulaire.

Afin d'évaluer l'impact de diverses molécules sur les fibroblastes de poumon humain, nous avons vérifié que celles-ci n'étaient pas cytotoxiques suivant 2 méthodes:

- au bromure d'éthidium et acridine orange; vérifier si les molécules testées altèrent ou non la perméabilité membranaire,
- au MTT; s'assurer que l'activité de certaines enzymes reste présente dans les mitochondries.

### 5.1. Méthode au bromure d'éthidium et acridine orange.

Cette méthode est décrite par **Parks et al., 1979**. L'acridine orange pénètre dans les cellules vivantes et colore leur noyau en vert fluorescent. Par contre, le bromure d'éthidium ne traverse pas la membrane des cellules vivantes, mais colore en noyau le noyau des cellules mortes.

#### 5.1.1. Matériels.

- Solution de coloration : 50 mg de bromure d'éthidium (E-8751, Sigma Chemical Company, U.S.A.) et 15 mg d'acridine orange (A-6014, Sigma Chemical Company, U.S.A.) sont dissouts dans 1 ml d'éthanol à 95 % et 49 ml d'eau. Cette solution est fractionnée en aliquotes de 1 ml et stockée à -20°C. Nous l'utilisons diluée 100 x dans du PBS: elle se conserve alors un mois à 4°C et à l'abri de la lumière.
- Milieu de resuspension : 100 ml, pH 7,4.

Saccharose	4,2788 gr	125 mM	(Tirlemont, Belgique).
KCl	0,48466 gr	65 mM	(Merck, Allemagne).
Tris - HCl	0,1211 gr	10 mM	(Merck, Allemagne).
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,0340 gr	2,5 mM	(Merck, Allemagne).
MgCl <sub>2</sub>	0,0204 gr	1 mM	(Merck, Allemagne).
EGTA	0,0126 gr	0,33 mM	(Sigma, U.S.A.).
- Digitonine : (Merck, Allemagne).

### 5.1.2. Méthodes.

Les cellules (10 millions) sont resuspendues dans 1,6 ml de milieu de resuspension. Pour ce test, différentes fractions de  $10^7$  cellules sont nécessaires et chacune d'elles est incubée 2 minutes en présence d'une concentration finale en digitonine déterminée : 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 40 $\mu$ M, 100  $\mu$ M.

10  $\mu$ M de la solution de coloration mis en contact avec 10  $\mu$ M de la solution « cellules - digitonine ». Le tout est placé entre lame et lamelle et est observé rapidement au microscope à fluorescence (Dialux 22, Allemagne).

On dénombre séparément les cellules vertes et oranges sur un total 150 cellules choisies au hasard .

Afin de savoir dans quelle mesure le temps d'incubation peut jouer un rôle, après 14 minutes , on réalise un nouveau comptage de la même lame porte-objets.

$$\text{Pourcentage de survie} = \frac{\text{nombre de cellules vertes}}{\text{nombre de cellules vertes et oranges}}$$

### 5.2. Méthode au MTT.

Basée sur l'activité des hydrogénases mitochondriales, cette méthode a été décrite par **Mosman (1983)** et améliorée par **Hansen et al. (1989)**.

Principe: les cellules métaboliquement actives incorporent un colorant jaune, le MTT [ bromure de 3 - (4, 5 - diméthylthiazol-yl)- 2,5 - diphényl tétrazolium ] et le clivent en son dérivé formazan (cristaux de coloration mauve, insolubles en milieu aqueux). Cette réaction est catalysée par une enzyme mitochondriale (la succinate déshydrogénase). En présence d'une molécule toxique, le nombre de cellules capables de réaliser cette réaction diminue et une corrélation peut être établie entre la viabilité cellulaire et la quantité de MTT réduit.

### 5.2.1. Matériels.

- Colorant MTT : Bromure de 3,(4,5 - diméthyl-thiazoyl-2-yl) 2,5  
diphényltétrazolium (Sigma Chemical Company, U.S.A.)  
préparé à une concentration de 2,5 mg / ml de PBS. Cette  
solution se conserve un mois à 4°C.
- Réactif de lyse : On prépare une solution à 30 % (W / V) de SDS  
[dodécylsulfate de sodium (C<sub>12</sub> H<sub>25</sub> NaO<sub>4</sub>S), Merck,  
Allemagne] dans de l'eau distillée. Cette solution est  
chauffée à 37 °C. On ajoute 1 volume de N, N-diméthyl-  
formamide (Merck, Allemagne) pour 2 volumes de SDS  
30 % et après dissolution complète, on met la solution à  
pH 4,7 en ajoutant quelques gouttes d'une solution acide  
contenant 9 volumes de l'acide acétique 80 % et 1 volume  
d' HCl 1 N. Cette solution doit être conservée à 37 °C,  
sinon elle précipite.
- Milieu de resuspension: 100 ml, pH 7,4.  
Saccharose 4,2788 gr 125 mM (Tirlemont, Belgique).  
KCl 0,48466 gr 65 mM (Merck, Allemagne).  
Tris - HCl 0,1211 gr 10 mM (Merck, Allemagne).  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0340 gr 2,5 mM (Merck, Allemagne).  
MgCl<sub>2</sub> 0,0204 gr 1 mM (Merck, Allemagne).  
EGTA 0,0126 gr 0,33 mM (Sigma, U.S.A.).  
(Merck, Allemagne).
- Digitonine : (Merck, Allemagne).
- Plaques multi - puits : Stériles et de 0,32 cm<sup>2</sup> de surface (96 puits) (Corning,  
U.S.A.).  
Stériles et de 2 cm<sup>2</sup> de surface (24 puits) (Corning,  
U.S.A.).
- BME + SB 10 % : Milieu BME additionné de 10 % de sérum de veau foetal  
(PAA Laboratories, Autriche).
- BME : Milieu basal de Eagle contenant les sels de Earle, 13 acides  
aminés essentiels et non essentiels, 8 vitamines (Gibco,  
Grande - Bretagne).



### 5.2.2. Méthodes.

Les fibroblastes sont repiqués dans des plaques multi-puits de 24 cupules de 2 cm<sup>2</sup> chacune à 100.000 cellules / puits dans 1 ml de BME + SB 10 %.

Le lendemain, le milieu des puits est décanté et on incube les cellules de la manière expliquée dans le tableau ci-dessous.

On réalise des quadruples.

Traitement des cellules	Milieux ajoutés
Témoins	milieu BME : 1 ml / puits.
Contrôle	milieu de resuspension : 1 ml / puits
Digitonine	milieu de resuspension + 20 µM digitonine (final)
Digitonine	milieu de resuspension + 50 µM digitonine (final)
Digitonine	milieu de resuspension + 75 µM digitonine (final)
Digitonine	milieu de resuspension + 100 µM digitonine (final)
Digitonine	milieu de resuspension + 125 µM digitonine (final)

Après 10 minutes, le milieu des puits est décanté et remplacé par 1 ml BME + 250 µl de MTT pendant 2 heures à 37°C (étuve 5 % CO<sub>2</sub>). Durant cette période, les cellules métaboliquement actives incorporent et clivent le MTT en son dérivé formazan.

Ensuite, le surnageant est délicatement décanté afin d'enlever toute trace de colorant non réduit; les puits sont rincés à l'aide de milieu de rinçage.

On ajoute 500 µl de réactif de lyse dans chaque puits afin de resolubiliser les cristaux de formazan colorés. Pour une bonne dissolution, les plaques sont incubées à 37°C durant une nuit.

La plaque multi-puits est alors agitée sur un plateau tournant, ensuite sur un vortex.

Afin de lire l'absorbance à 595 nm sur un lecteur de plaques multi-puits (Modèle 3.550, Bio-RAD, U.S.A.), 100 µl de chaque cupule sont prélevés et déposés dans un puits d'une plaque comportant 96 puits.

**Pourcentage de survie =**

$$\left[ \frac{\text{Absorbance des cellules traitées} - \text{Absorbance des « blancs »}}{\text{Absorbance des cellules contrôlées} - \text{Absorbance des « blancs »}} \right] \times 100$$

Les blancs sont constitués de 100 µl de réactif de lyse.

On réalise la même expérience avec du milieu de resuspension auquel on ajoute différentes concentrations en digitonine (20 µM, 50 µM, 75 µM finales); l'osmolarité ayant augmenté, on corrige avec de l'eau.

## IV. Résultats et discussion.

### 1. Rôle du métabolisme énergétique dans la survie des cellules à des stress.

Selon le modèle expliqué dans l'introduction, la cellule utilise globalement deux grands types de mécanismes pour se défendre face à des stress. D'une part, elle utilise des systèmes de défense spécifique aux stress encourus, par exemple le système antioxydant lors de stress oxydatifs. D'autre part, pour faire fonctionner ces systèmes de défense, elle utilise de l'énergie libre notamment pour permettre l'induction d'enzymes de défense ou de réparation, comme les enzymes antioxydantes induites par exemple dans la peau lors de brûlures (Niwa, 1987) provoquant une inflammation locale, ou les enzymes de réparation de l'ADN après des stress oxydatifs, ou aussi pour permettre la production et la régénération de co-substrats comme la glutathion qui est nécessaire à l'activité de la glutathion peroxydase et qui est régénérée par la glutathion réductase, elle-même dépendante de l'activité de la glucose - 6 - phosphate déshydrogénase qui produit le NADPH nécessaire à son activité.

Pour tester l'hypothèse du rôle du métabolisme énergétique, nous avons soumis des fibroblastes WI - 38 en culture à des stress sous éthanol ou sous TBHP de différentes intensités en présence ou non de D - glucose. Selon l'hypothèse de départ, le D - glucose doit protéger les cellules contre des stress de nature très différente, d'où notre choix de réaliser des stress sous éthanol ou sous TBHP et de tester si le D - glucose permet une meilleure survie des cellules stressées.

Pour tester le rôle des systèmes de défense, nous avons soumis des fibroblastes WI - 38 aux mêmes types de stress mais cette fois en présence d'antioxydants. L'action de molécules antioxydantes lors de stress sous éthanol n'ayant jamais été montrée, nous pensions donc que les antioxydants protégeraient uniquement les cellules soumises au TBHP et non celles soumises à l'éthanol.

Enfin, au vu des données présentées dans l'introduction concernant le rôle du métabolisme calcique dans la résistance aux stress, nous testerons si la cyclosporine A exerce une protection sur les cellules soumises aux 2 types de stress décrits ci-dessus.



Afin d'observer le rôle du métabolisme énergétique sur la résistance des cellules à des stress létaux, nous avons choisi arbitrairement 2 types d'agressions ; l'une provoque une production de radicaux libres dérivés de l'oxygène et consiste en l'incubation des cellules à diverses concentrations en TBHP, l'autre est la présence de différentes concentrations en éthanol.

L'influence de celles-ci sur la mortalité cellulaire a été enregistrée en dosant les protéines cellulaires selon la méthode de **Lowry et al. (1951)** 2 jours après un stress. Ce délai, nécessaire au détachement des débris cellulaires, a été déterminé après dosage de protéines au cours du temps à la suite de stress totalement létaux (TBHP  $2.10^{-2}$  M dilué dans du PBS pendant 1 heure). D'autre part, les mitoses cellulaires sont inhibées pendant au moins 2 jours après de tels stress (**Toussaint et al., 1992**).

La théorie thermodynamique, décrite dans l'introduction, prédit que les cellules confrontées à des conditions de stress augmentent leur consommation d'énergie qu'elles puisent dans leurs réserves ou qu'elles extraient l'énergie de leur environnement. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons choisi d'approcher le problème en testant la résistance cellulaire à des conditions stressantes en modifiant la composition du milieu de stress. Les conditions testées étaient les suivantes : les cellules ont été soumises à des stress de 1 heure sous TBHP dilué dans du tampon PBS  $10^{-5}$ ,  $5.10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $5.10^{-4}$  et  $10^{-3}$  M. Les stress sous éthanol duraient 2 heures, l'éthanol étant dilué dans du PBS à raison de 1,5; 4,5; 6 et 7 % v/v (comme expliqué dans matériels et méthodes). Deux jours après les stress, la quantité de protéines cellulaires a été mesurée et exprimée en pourcentage de la quantité de protéines présentes dans les contrôles incubés en présence de PBS seul. Des quadruples ont été effectués lors de chacune des 3 expériences et les résultats sont exprimés en tant que moyennes  $\pm$  écart types, comme ce sera le cas dans les expériences présentées ultérieurement.

### 1.1. D - glucose.

Concernant les stress sous TBHP, nous observons une mortalité croissante au fur et à mesure que les concentrations augmentent. Afin d'estimer leur éventuel effet de protection, différentes molécules ont été ajoutées aux cellules pendant les stress réalisés sous TBHP et éthanol (dilués dans du PBS).

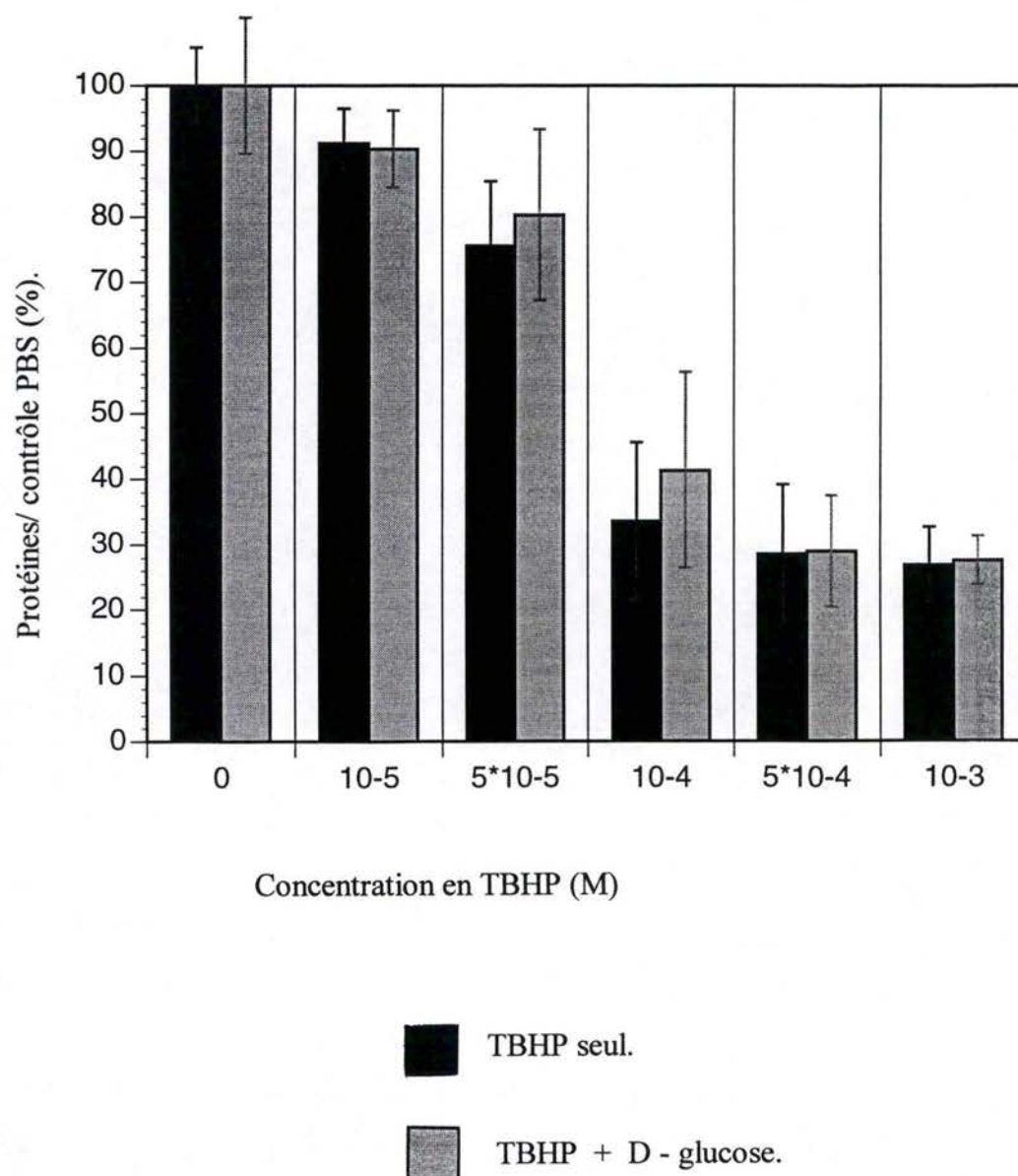


Figure 14. Effet du D - glucose 5 mM sur la survie des fibroblastes WI - 38 confrontés à des stress d'intensité croissante sous TBHP. Les protéines cellulaires ont été dosées deux jours après le stress et les résultats sont exprimés en fonction la concentration molaire en TBHP et en pourcentage de la quantité de protéines présente dans les contrôles non exposés au TBHP.



Nous ne sommes parvenus à mettre en évidence qu'une faible protection exercée par le D - glucose (fig. 14) et ce aux concentrations intermédiaires en TBHP à  $5.10^{-5}$  M et  $10^{-4}$  M. Par rapport aux résultats précédents, nous retrouvons une absence de protection aux plus fortes concentrations; le stress étant trop intense pour que la présence de D - glucose ait un quelconque effet protecteur. De manière opposée, aucun effet protecteur n'est observé à la plus faible concentration en TBHP car il touche uniquement les cellules les plus sensibles au stress ; il est difficile de trouver un effet protecteur lorsque nous observons une faible mortalité : le stress n'est pas assez intense (en fait la quantité de protéines obtenues n'est pas statistiquement différente de celle obtenue pour les cellules témoins exposées au PBS seul) que pour permettre un effet protecteur du D - glucose fourni pendant le stress. Par rapport aux résultats acquis précédemment, nous n'avons pas obtenu de protection du D - glucose statistiquement significative à  $5.10^{-5}$  M et  $10^{-4}$  M (Toussaint et al., 1994), nous attribuons ceci au fait que ces expériences ont été réalisées sur des fibroblastes se situant entre 37 et 41 passages en culture, ce qui représente des cellules âgées où un déficit du métabolisme énergétique est possible. Les expériences précédentes avaient été réalisées sur des cellules jeunes présentant un métabolisme énergétique intact (Toussaint et al., 1994).

Des expériences préliminaires visant à mesurer le niveau du métabolisme énergétique des cellules jeunes ou vieilles seront d'ailleurs présentées en fin de cette partie du mémoire consacrée aux résultats.

Notons que des travaux précédents avaient montré que le D - glucose montrait un effet protecteur alors que le L - glucose n'en montrait pas, ce qui confirmait un effet métabolique du D - glucose et non pas seulement un éventuel effet antioxydant du glucose. De plus, le pyruvate s'était aussi montré protecteur alors que le phosphoénolpyruvate ne donnait aucune protection puisque son groupement phosphate l'empêchait d'entrer dans les cellules. Notons qu'on a montré que la présence de D - glucose permettait un maintien de la concentration intracellulaire en ATP au cours du stress. Enfin, aucun effet protecteur supplémentaire de pyruvate et du D - glucose n'était observé lorsqu'ils étaient incubés simultanément lors de stress sous TBHP, ce qui semble exclure une action exclusive du D - glucose sur l'activité de la glutathion peroxydase via la régénération du glutathion par la glutathion réductase utilisant le NADPH généré par le glucose - 6 - phosphate déshydrogénase lors d'une des premières étapes de la glycolyse.



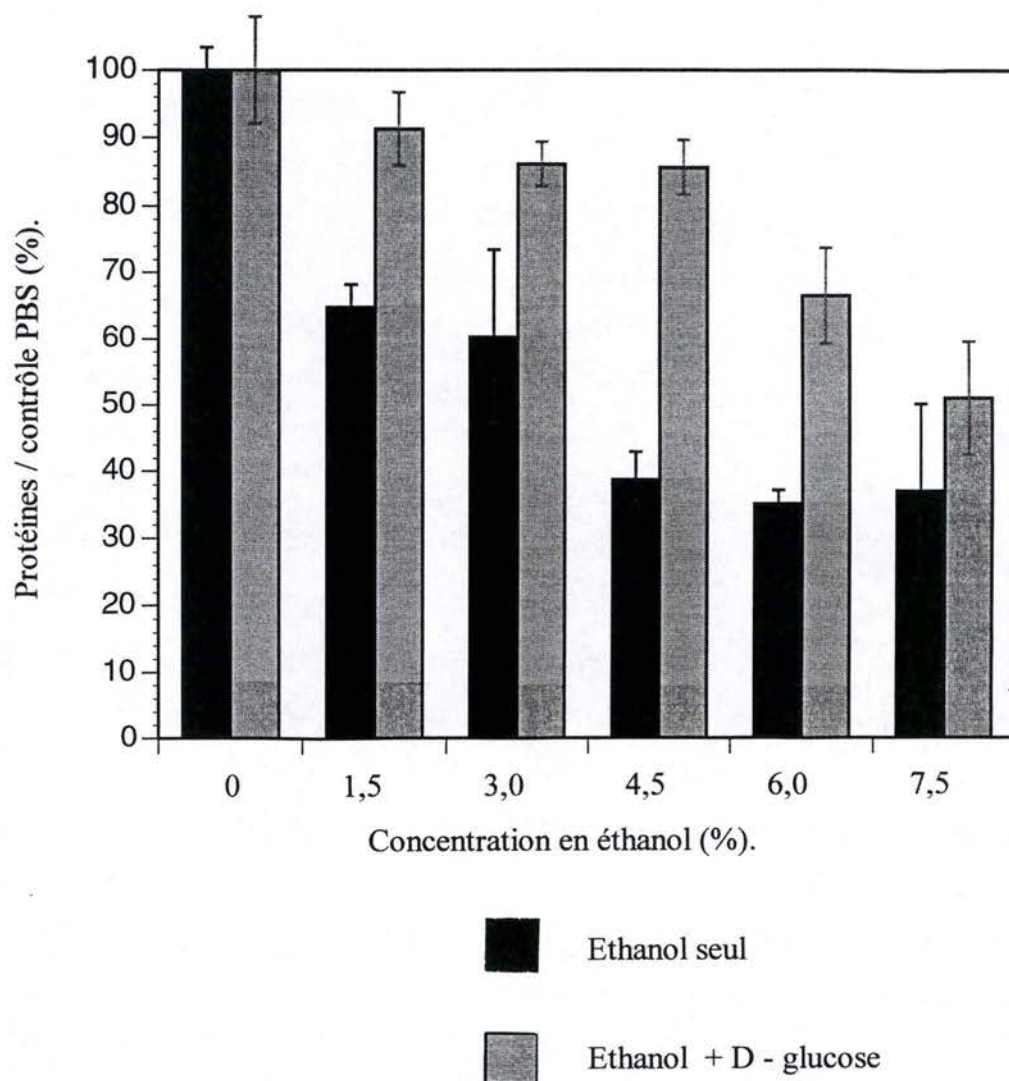


Figure 15. Effet du D - glucose 5 mM sur la survie des fibroblastes WI - 38 confrontés à des stress d'intensité croissante sous éthanol. Les protéines cellulaires ont été dosées deux jours après le stress et les résultats sont exprimés en fonction de la concentration molaire en éthanol et en pourcentage de la quantité de protéines présente dans les contrôles non exposés à l'éthanol.

Passons à présent aux résultats obtenus lors de stress sous éthanol en absence ou en présence de D - glucose 5 mM.

Dès 1,5 % v/v en éthanol, nous observons une mortalité cellulaire avoisinant les 30 % par rapport aux contrôles. Cette cytotoxicité s'accroît au fur et à mesure que la concentration en éthanol croît pour être supérieure à 60 % à 6,0 et 7,5 % v/v en éthanol. Une protection est exercée par le D - glucose (fig. 15) à toutes les concentrations en éthanol. Cette protection est statistiquement significative à 1,5; 3,0; 4,5 et 6,0 % v/v en éthanol. Cette significativité est perdue à la plus forte concentration en éthanol. On peut raisonnablement émettre l'hypothèse que les effets déleterés de cette concentration en éthanol sont tellement importants qu'une intervention énergétique est vaine pour tenter de rétablir l'homéostasie cellulaire. Ces expériences, réalisées pour la première fois, montrent une importance cruciale du D - glucose dans la survie des cellules confrontées à des stress sous éthanol.

Comment le D - glucose pourrait -il protéger les cellules contre des stress sous éthanol ? Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'éthanol a des effets multiples sur le métabolisme cellulaire et un des effets immédiats les plus marqués est la modification des échanges ioniques et surtout une entrée massive de  $\text{Ca}^{++}$  dans le cytoplasme. L'ATP produit à partir du D - glucose fourni aux cellules sert donc vraisemblablement en partie à alimenter les pompes calciques de la membrane plasmique dont l'activité est dépendante de la présence d'ATP.

Lors de la glycolyse, du cycle de Krebs et des phosphorylations oxydatives, une partie de l'énergie présente dans les liaisons chimiques de D - glucose est convertie sous forme de liaisons chimiques riches en énergie comme les liaisons entre phosphates dans l'ATP ou sous forme de molécules réduites (NADPH) alors qu'une autre partie est dissipée en chaleur perdue par la cellule. Les molécules énergétiques formées (ATP, NADPH) sont alors utilisées dans l'anabolisme et dans toutes les fonctions cellulaires requérant de l'énergie.

Puisque la quantité d'énergie libre disponible est limitée, l'évolution a permis la mise au point d'une régulation globale et complexe prenant place à l'intérieur de la cellule et agit comme un système très régularisé. Les processus de stress demandant de l'énergie, il est donc tout à fait réaliste de prévoir une augmentation des besoins cellulaires en glucose. La réponse de la cellule à une augmentation des besoins en énergie dans des conditions stressantes a été confirmée par le fait que des stress induisent l'expression accrue du transporteur du glucose dans toute une série de stress ou stimulations comme par

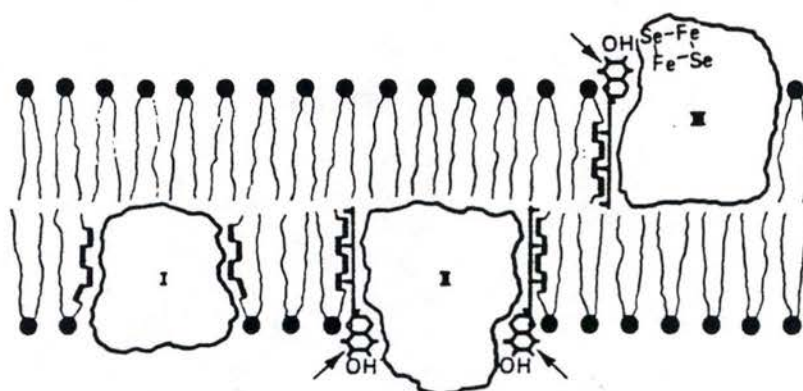


FIG. 3 Proposed localization of the tocopherol molecule (see arrows) in the membrane. I = integral protein; II = integral protein, forming part of a mixed function oxidase; III = integral selenide-containing non-heme iron protein.

Figure 16 . Localisation de l' $\alpha$  - tocophérol dans la bicouche lipidique des membranes biologiques (Molenaar, 1980).



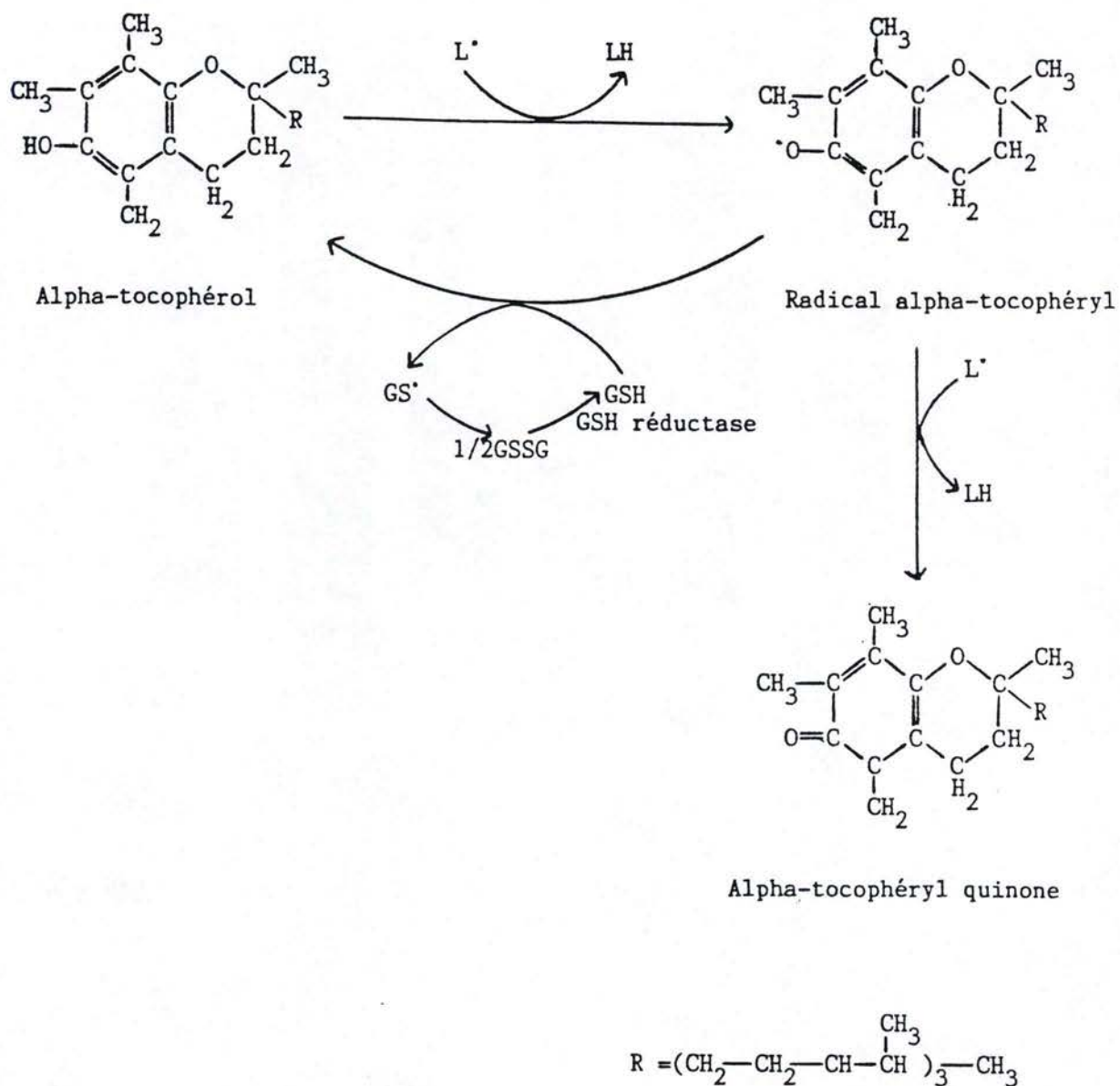


Figure 17 . Structure et mode d'action de l' $\alpha$  - tocophérol .

(Leibovitz et Siegel, 1980).

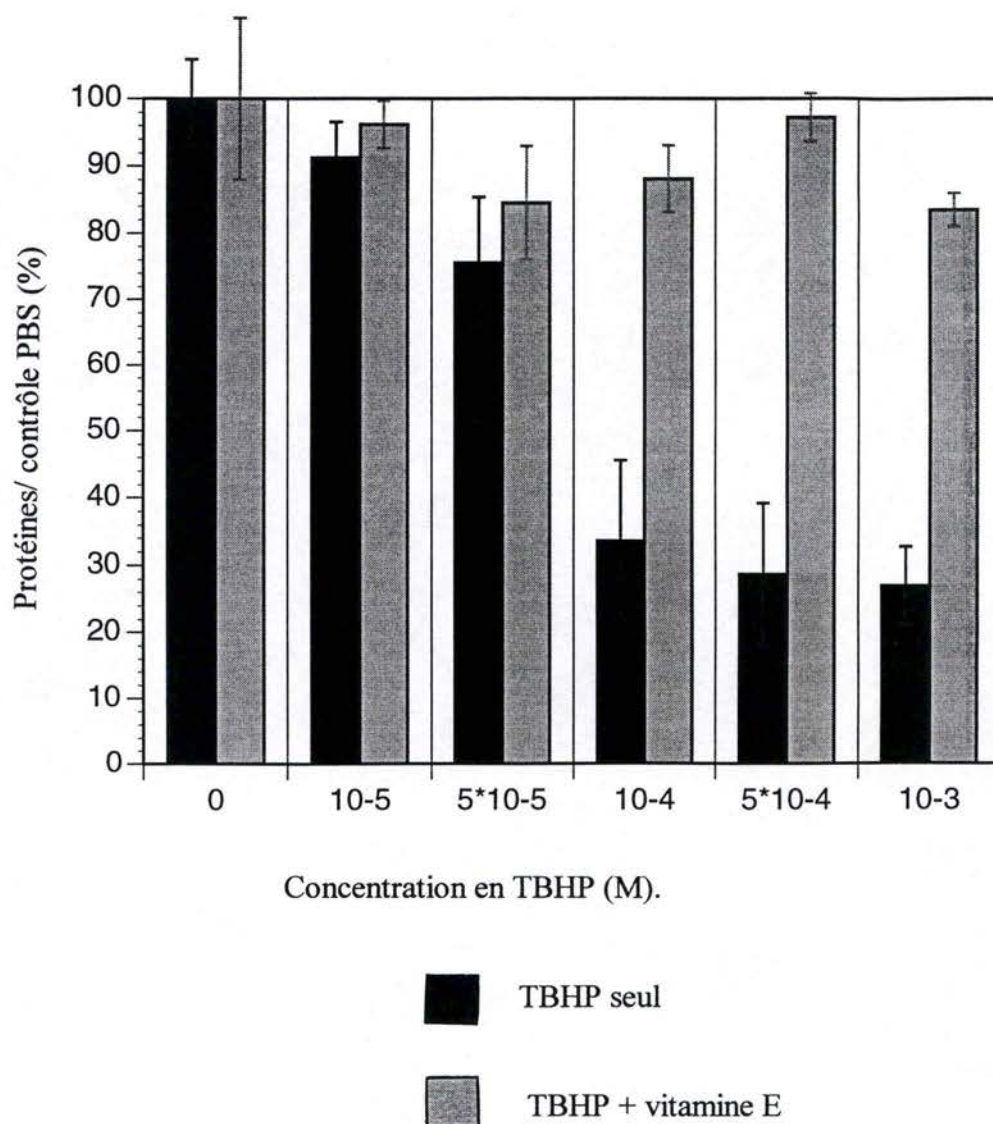


Figure 18 . Effet de la vitamine E 1 mM sur la survie des fibroblastes WI - 38 confrontés à des stress d'intensité croissante sous TBHP. Les protéines cellulaires ont été dosées 2 jours après le stress et les résultats sont exprimés en fonction de la concentration molaire en TBHP et en pourcentage de la quantité de protéines présente dans les contrôles non exposés au TBHP.

exemple: exposition à l'arsenic, privation de glucose, stimulation à l'insuline ou au sérum, ... (Pasternak et al., 1991).

Après avoir montré que le métabolisme énergétique joue un rôle dans la protection des cellules exposées à des stress aussi divers que la présence de TBHP ou d'éthanol, nous allons tester les effets du niveau d'un système de défense cellulaire, dans notre cas le système antioxydant, sur la survie des cellules confrontées à un stress oxydatif (ici le TBHP) et à un stress non oxydatif (ici l'éthanol).

Nous avons testé deux molécules antioxydantes : l' $\alpha$  - tocophérol (la vitamine E) et la N - acétylcystéine, dont nous allons vous présenter brièvement les propriétés avant de décrire les résultats obtenus.

## 1.2. Vitamine E (ou $\alpha$ - tocophérol).

La vitamine E (tout comme les vitamines A et K) fait partie des vitamines liposolubles. Elle est présente dans les bicouches lipidiques des membranes biologiques (fig. 16), y exerce une action antioxydante notamment en capturant les électrons des radicaux peroxydes lipidiques et interrompt ainsi la peroxydation lipidique (fig. 17). Chaque molécule de vitamine E peut capter 2 électrons. Le fait d'ajouter de la vitamine E aux milieux de stress devrait donc protéger les cellules contre les radicaux libres générés par le TBHP.

Pour tester le rôle de la vitamine E dans la protection des cellules contre la toxicité du TBHP et de l'éthanol, les fibroblastes furent pré-incubés pendant 24 heures à une concentration de  $10^{-3}$  M en vitamine E pour permettre une bonne incorporation de celle-ci dans les membranes cellulaires.

La vitamine E (fig. 18) offre une protection remarquable contre les stress de  $5 \cdot 10^{-5}$  M à  $10^{-3}$  M. En fait, à chaque concentration en TBHP testée, on obtient une quantité de protéines statistiquement plus faible que celle obtenue pour les témoins. Nous avons ensuite réalisé des stress de 2 heures sous différentes concentrations en éthanol en présence de vitamine E (fig. 19). Alors que nous avons observé un effet protecteur de la vitamine E à toutes les concentrations en TBHP, nous observons uniquement un effet protecteur de la vitamine aux plus faibles concentrations en éthanol.

Plusieurs explications sont possibles :

Premièrement, il est possible que l'éthanol introduise sa courte chaîne carbonée dans des micelles formées de vitamine E présentes dans le milieu lors du stress, ceci ayant un effet



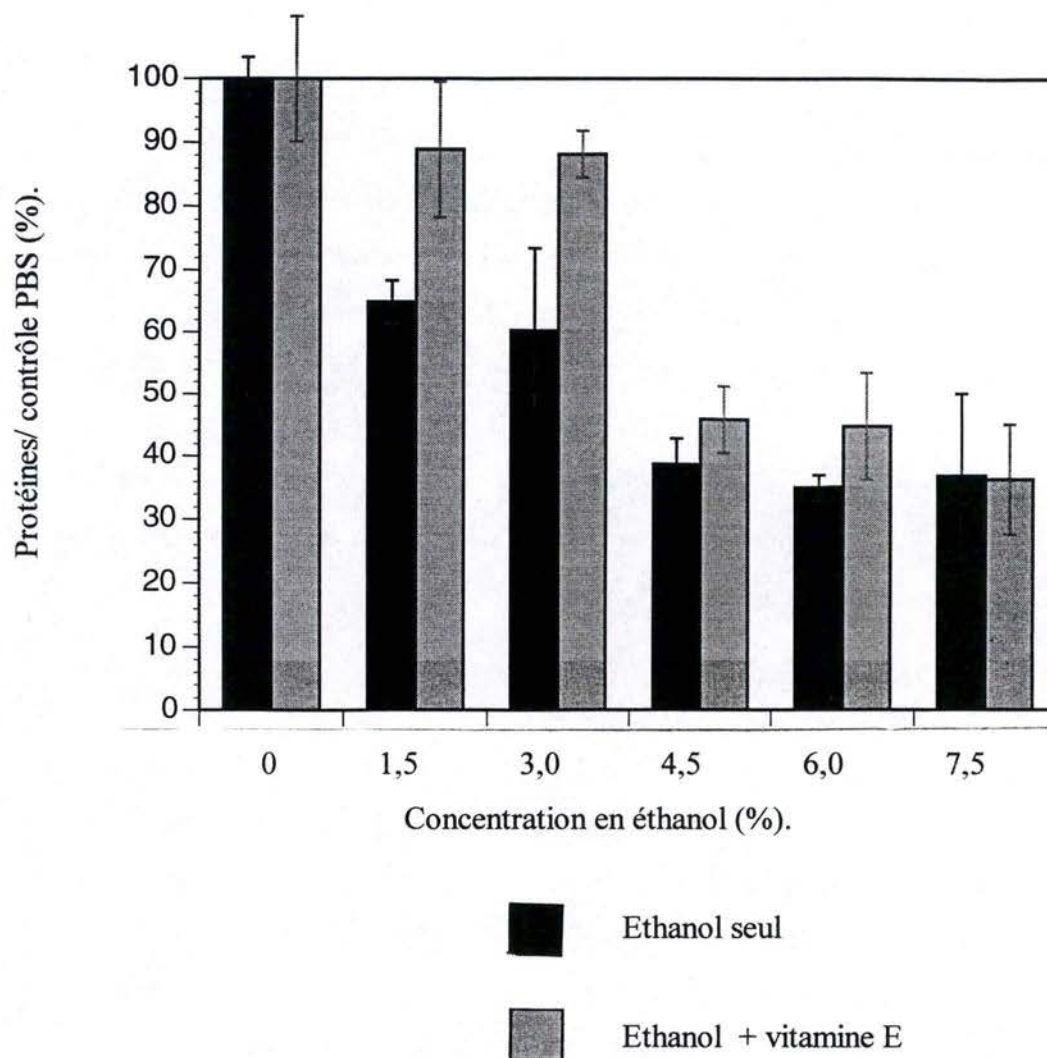


Figure 19. Effet de la vitamine E 1 mM sur la survie des fibroblastes WI - 38 confrontés à des stress d'intensité croissante sous éthanol. Les protéines cellulaires ont été dosées deux jours après le stress et les résultats sont exprimés en fonction de la concentration molaire en éthanol et en pourcentage de la quantité de protéines présente dans les contrôles non exposés à l'éthanol.

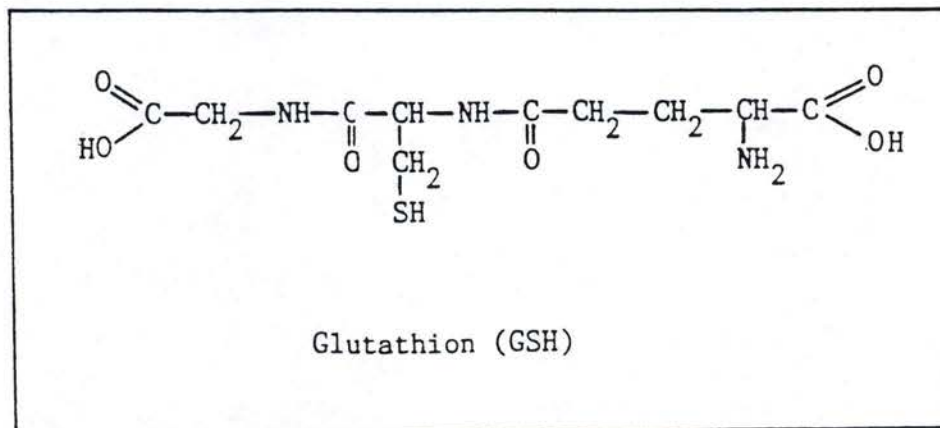


Figure 20. Structure du glutathion.

Le glutathion est un tripeptide ( $\gamma$  - glutamyl - cystéinyl - glycine) dont la cystéine joue un rôle d'antioxydant du fait de la présence de sa fonction thiol (-SH).

# METABOLIC FATE OF GLUTATHIONE IN FREE RADICAL EXPOSED CELLS ---

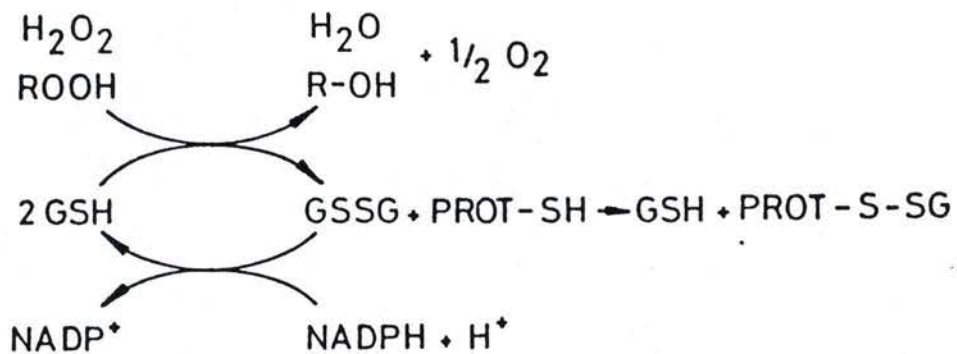


Figure 21. Réaction d'oxydation du glutathion (catalysée par la GPX) et régénération du glutathion réduit par la glutathion réductase, qui utilise du NADPH coome source de potentiel réducteur. Ce NADPH est régénéré quant à lui, à partir du NADP par la glucose - 6 - phosphatase déshydrogénase (Cotgreave, 1998).



diluant constant sur la vitamine E, diminuant ainsi l'effet direct de l'éthanol sur les cellules.

Deuxièmement, si la production de radicaux libres n'a jamais été mise en évidence, il est néanmoins possible que de faibles concentrations en dérivés actifs de l'oxygène, non cytotoxiques, soit synthétisées lors du processus d'activation cellulaire qui a lieu lors de la réponse cellulaire au stress.

Par exemple, on peut imaginer que l'éthanol déclenche l'apoptose des cellules et que la vitamine E réagisse avec les radicaux libres formés lors de l'initiation de la transduction du signal déclenchée par la vitamine E. Il serait intéressant de tester ces hypothèses, mais elles sortent du cadre immédiat de ce travail.

Après avoir testé l'effet de la vitamine E, nous avons voulu confirmer nos résultats en utilisant un autre antioxydant : la N - acétylcystéine.

### 1.3. N - Acétyl - L - Cystéine

Très hydrophile, la molécule de N - Acétyl - L - Cystéine exerce un effet antioxydant dans le cytoplasme des cellules de 2 manières différentes.

Elle a un rôle anti-oxydant direct par l'oxydation de la fonction thiol de sa cystéine et elle intervient dans la synthèse du glutathion réduit (GSH).

Le glutathion est un tripeptide ( $\gamma$  - glutamyl - cysteinyl - glycine) présent dans les cellules sous forme réduite (sa forme oxydée ne représente qu'une faible proportion en condition non oxydatives) (fig. 20).

Il est synthétisé en 2 étapes catalysées par LA GSH synthédase et par la

$\gamma$  -glutamylcystéine synthétase qui peut utiliser la cystéine du N - Acétylcystéine comme substrat, celle-ci jouant un rôle de précurseur du glutathion. Ce dernier peut réagir directement avec les radicaux libres ( $O_2^{\cdot(-)}$ ,  $\cdot OH$ ,  $RO\cdot$ ) par un processus radicalaire qui le transforme en  $GS\cdot$  puis en GSSG (2 molécules de glutathion oxydé formant un pont disulfuré) (Cotgreave, 1988) ou intervenir dans la réduction des hydroperoxydes (tel que  $H_2O_2$ ).

Via la glutathione peroxydase qui est une enzyme antioxydante localisée dans les mitochondries et le cytoplasme de la cellule des mammifères dans une proportion de 1/3 (fig. 21), nous avons réalisé des expériences de stress sous TBHP similaires à celles présentées ci-dessus et dans lesquelles la vitamine E a été remplacée par de la

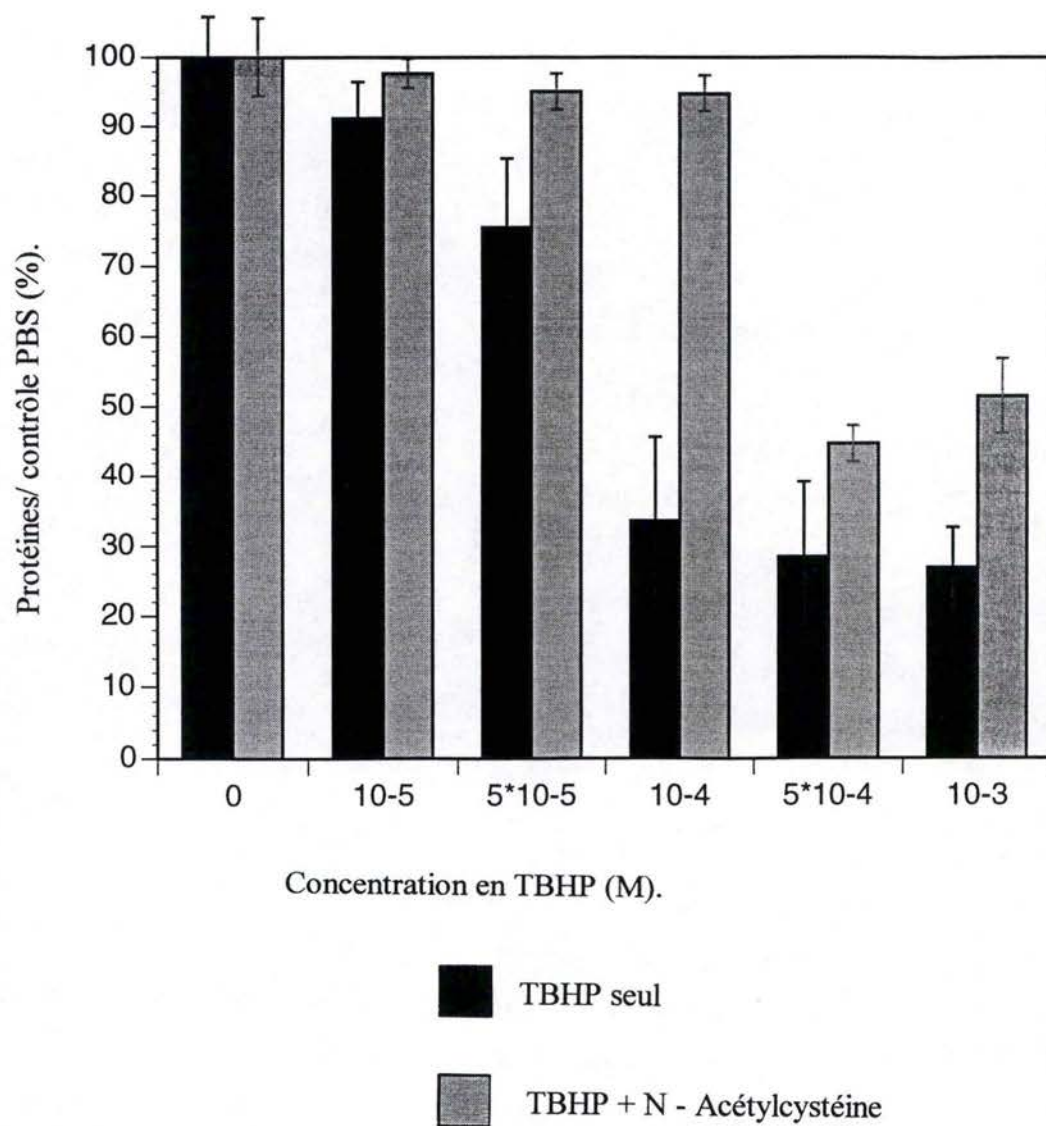


Figure 22 . Effet du N - Acétylcystéine 5 mM sur la survie des fibroblastes WI - 38 confrontés à des stress d'intensité croissante sous TBHP. Les protéines cellulaires ont été dosées 2 jours après le stress et les résultats sont exprimés en fonction de la concentration molaire en TBHP et en pourcentage de la quantité de protéines présente dans les contrôles non exposés au TBHP.



N - acétylcystéine 5 mM (fig. 22). Qu'obtient-on comme résultat ? Une protection est exercée par la N - acétylcystéine à toutes les concentrations en TBHP testées où le TBHP a un effet cytotoxique significatif par rapport aux contrôles sous TBHP; c'est à dire de  $5.10^{-5}$  M à  $10^{-3}$  M en TBHP. Cet effet est légèrement inférieur à celui de la vitamine E.

Ces expériences confirment un effet protecteur des antioxydants contre le stress sous TBHP et donc, les résultats obtenus dans la littérature (pour une revue, **Toussaint et al., 1993**). Cependant, nous avons testé si le remplacement de la vitamine E par la N - acétylcystéine lors d'expériences de stress sous éthanol procurerait aussi une protection sur la survie des cellules. Cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et a montré des effets protecteurs notables à différentes concentrations en éthanol. Ces résultats demandent cependant confirmation. **P. Dumont et O. Toussaint** ont montré que la présence d'un antioxydant, la N - acétylcystéine, protège les fibroblastes humains contre un vieillissement accéléré provoqué par des incubations successives sous interleukine - 1  $\alpha$  ou sous Tumor Necrosis Factor -  $\alpha$  (TNF -  $\alpha$ ) parce que les voies de transduction du signal généré par la fixation de ces cytokines à leurs récepteurs respectifs conduit à une production intracellulaire de radicaux libres qui génère des dommages qui, lorsqu'ils s'accumulent, conduisent à un vieillissement accéléré des fibroblastes humains (**Toussaint et al., 1996**).

D'autre part, les stress osmotiques, dont font partie les stress sous éthanol, induisent le recrutement et l'internalisation des récepteurs à l'interleukine - 1 et au « Tumor Necrosis Factor » (TNF -  $\alpha$ ) et miment donc l'induction de certaines voies de transduction du signal généré par ces cytokines, où sont potentiellement impliquées des productions de radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire d'où un effet protecteur potentiel de la vitamine E.

#### 1.4. Recherche de la protection de survie cellulaire contre les stress en agissant sur le métabolisme calcique des mitochondries.

Comme nous l'avons présenté dans l'introduction, lors d'une augmentation temporaire en calcium au niveau du cytoplasme, celui-ci est pompé par les mitochondries (cf. 6. Introduction). Lorsque la concentration mitochondriale en  $Ca^{++}$  devient trop importante, il existe un processus de relargage brutal de  $Ca^{++}$  dans le cytoplasme. Nous avons voulu tester si l'accumulation momentanée de  $Ca^{++}$  dans la mitochondrie était « plus favorable



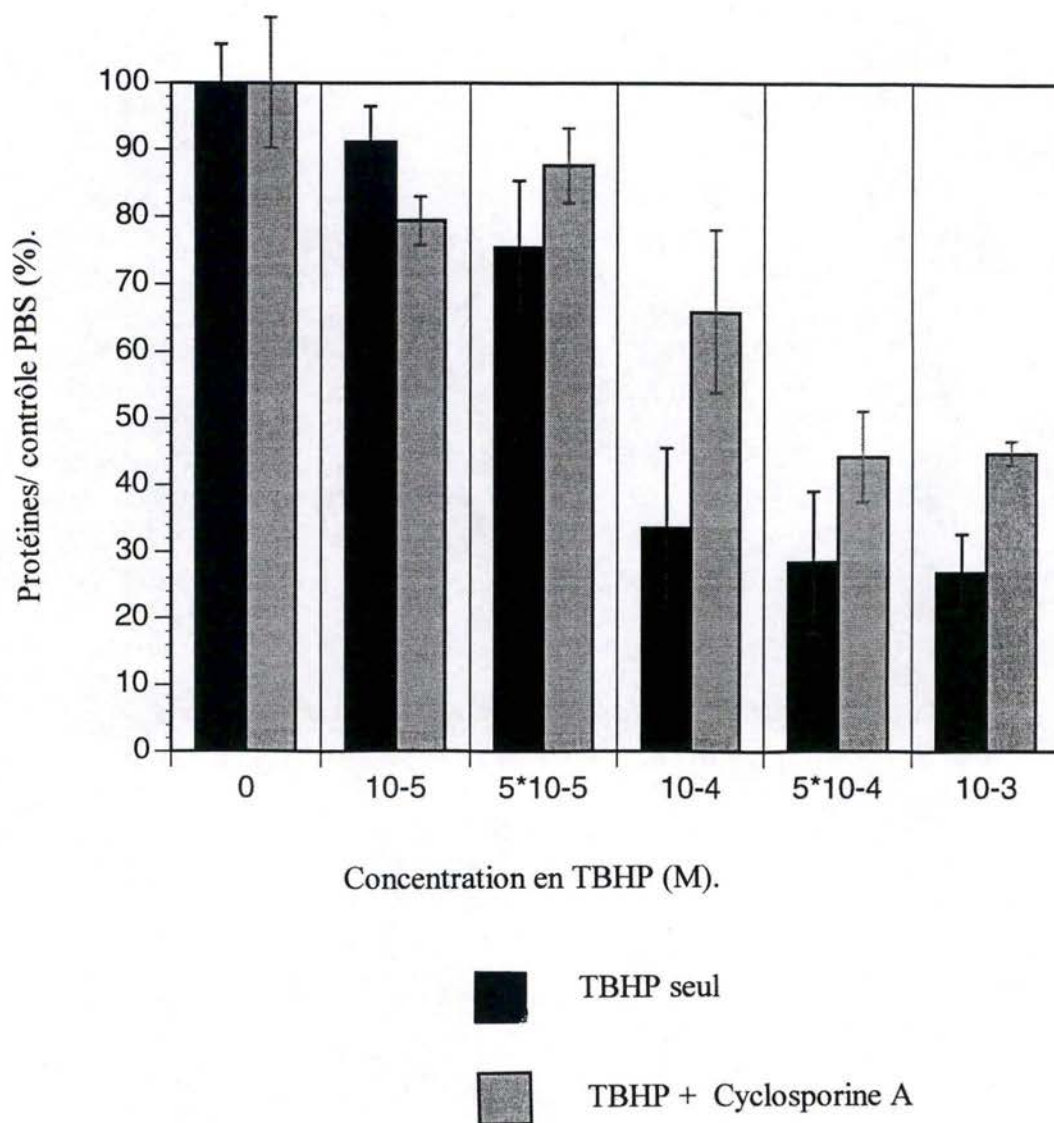


Figure 23 . Effet de la cyclosporine A 5  $\mu$ M sur la survie des fibroblastes WI - 38 confrontés à des stress d'intensité croissante sous TBHP. Les protéines cellulaires ont été dosées 2 jours après le stress et les résultats sont exprimés en fonction de la concentration molaire en TBHP et en pourcentage de la quantité de protéines présente dans les contrôles non exposés au TBHP.

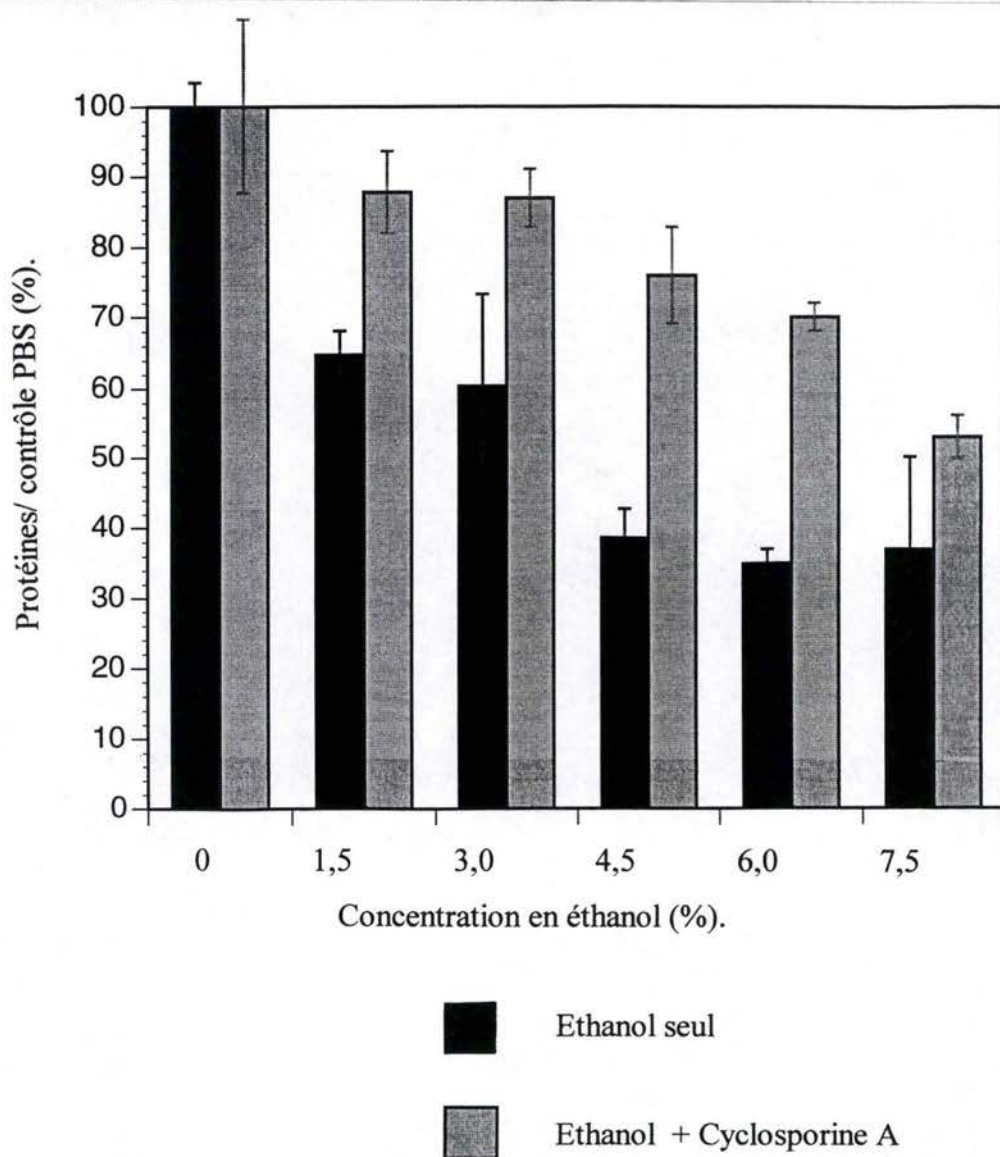


Figure 24. Effet de la cyclosporine A 5  $\mu$ M sur la survie des fibroblastes WI - 38 confrontés à des stress d'intensité croissante sous éthanol. Les protéines cellulaires ont été dosées deux jours après le stress et les résultats sont exprimés en fonction de la concentration molaire en éthanol et en pourcentage de la quantité de protéines présente dans les contrôles non exposés à l'éthanol.

à la survie cellulaire» que le relargage brutal de  $\text{Ca}^{++}$  dans le cytoplasme. L'hypothèse de travail étant qu'en bloquant ce relargage brutal, et donc en maintenant uniquement les processus de relargage lents, la concentration en  $\text{Ca}^{++}$  cytoplasmique pourrait avoir le temps de se rétablir lentement empêchant ainsi les déclenchements de mécanisme conduisant à la mort cellulaire.

Pour que cette hypothèse soit valide, il faut aussi que le  $\text{Ca}^{++}$  ne reste pas non plus trop longtemps à un niveau fort élevé dans les mitochondries puisque l'on sait qu'une concentration élevée de  $\text{Ca}^{++}$  dans les mitochondries inhibe les phosphorylations oxydatives, et font donc chuter la concentration cellulaire en ATP, ce qui compromet aussi la survie à court terme.

Expérimentalement, nous avons réalisé des stress sous TBHP (1 h) ou sous éthanol (2h) à diverses concentrations de la même manière que dans les expériences précédentes et nous avons ajouté de la cyclosporine A 5  $\mu\text{M}$  au milieu de stress. Nous avons dosé les quantités de protéines cellulaires présentes 2 jours après le stress et avons exprimé les résultats en pourcentage de la quantité de protéines présente dans les contrôles incubés sans TBHP ou sans éthanol.

Voici les résultats obtenus en ce qui concerne premièrement les stress sous TBHP (fig. 23). Comme dans les expériences précédentes, nous avons retrouvé un effet cytotoxique progressif du TBHP en fonction de sa concentration. Un effet protecteur de la cyclosporine A est observé à partir de  $5 \cdot 10^{-5}$  M et TBHP jusque  $10^{-3}$  M en TBHP.

Lorsque nous effectuons le rapport exprimé en % entre les valeurs obtenues avec cyclosporine et sans cyclosporine aux mêmes concentrations respectives, nous obtenons respectivement 16 %, 96 %, 54 % et 66 % de protection à  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$  et  $10^{-3}$  M et TBHP. Malgré l'augmentation très importante de l'intensité du stress lorsqu'on augmente la concentration en TBHP, on remarque que la cyclosporine A permet une protection importante de la survie cellulaire.

Après les stress sous éthanol (fig. 24), nous observons une protection importante de la cyclosporine A qui est significativement différente des contrôles sans cyclosporine A aux concentrations respectives en éthanol, excepté à 7,5 % en éthanol, où l'écart - type de la valeur contrôle sans cyclosporine A est anormalement élevé.

Nous avons ensuite calculé repris les protections conférées par la cyclosporine comme étant le rapport exprimé en % qui existe entre la valeur de pourcentage de protéines obtenues avec cyclosporine et sans cyclosporine A et ce, à chaque concentration en TBHP et en éthanol (Tableau 2).



		% de survie sans cyclosporine A. (en % de protéines/ contrôle PBS).	% de protection par la cyclosporine A.
<b>Concentration en TBHP (M)</b>	$10^{-5}$	91,2 ± 5,3	< 0
	$5.10^{-5}$	75,4 ± 9,9	16,1
	$10^{-4}$	33,6 ± 12,0	96,1
	$5.10^{-4}$	26,5 ± 10,7	55,4
	$10^{-3}$	26,9 ± 5,8	66,5
<b>Concentration en éthanol (%)</b>	1,5	64,7 ± 3,4	35,7
	3,0	60,2 ± 13,1	44,5
	4,5	38,7 ± 4,1	96,3
	6,0	35,1 ± 2,0	99,4
	7,5	37 ± 13,1	43,2

Tableau 2. Pourcentages de protection conférés pour la cyclosporine A 5  $\mu$ M.

Le mode de calcul de ces pourcentages est exposé dans le texte.

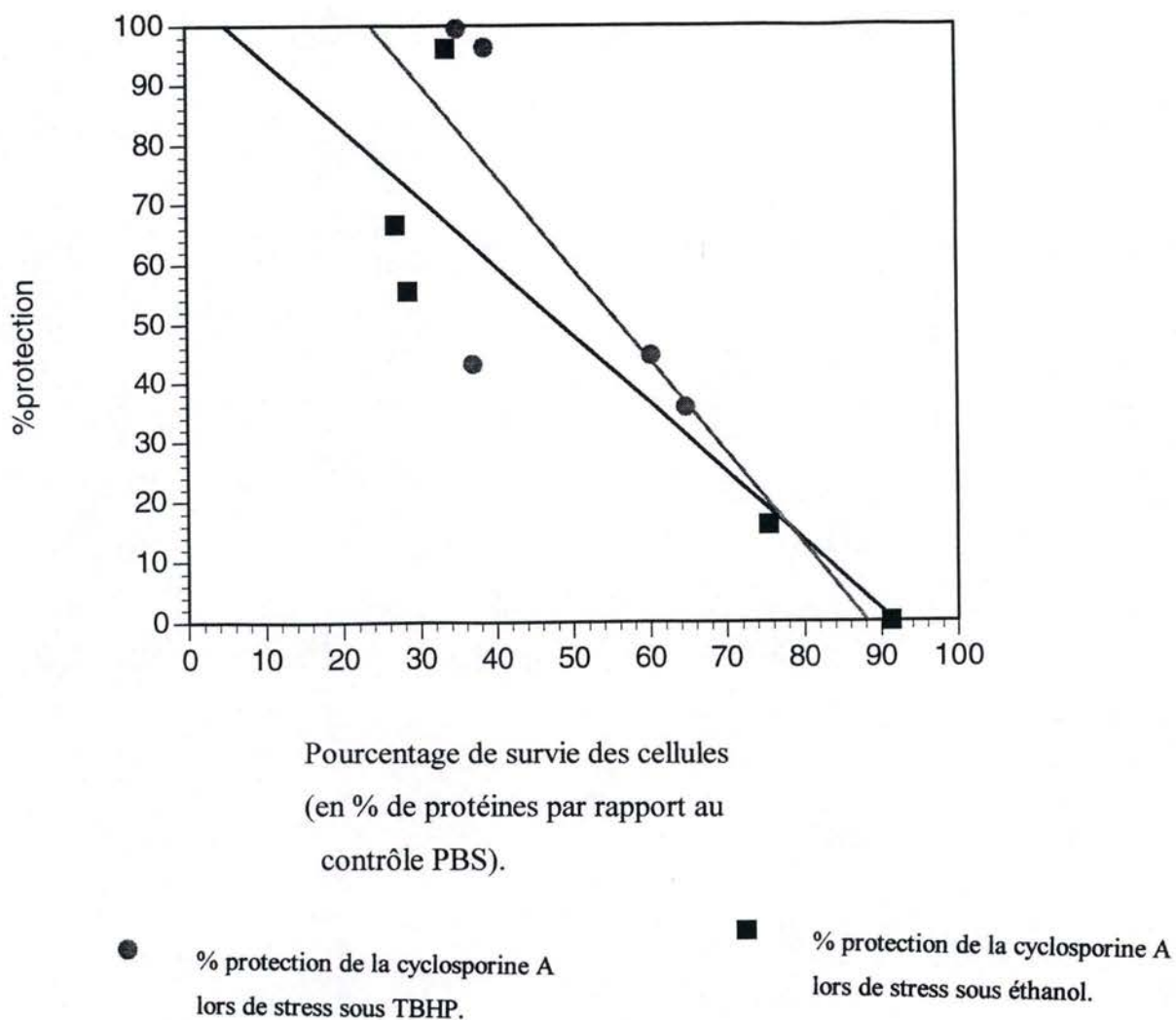


Figure 25. Pourcentage de protection procurée par la cyclosporine A en fonction des pourcentages de survie des cellules confrontées soit à du TBHP ( $10^{-5}$ ,  $5.10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $5.10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  M), soit à de l'éthanol (1,5 , 3,0 , 4,5 , 6,0 , 7,5 % v/v). Les pourcentages de protection ont été calculé en faisant le rapport entre le pourcentage de protéines obtenues avec cyclosporine A et sans cyclosporine A. La valeur obtenue est multipliée par 100 et on a ensuite retiré 100 % pour obtenir le pourcentage de protection.

A. Concentration en TBHP	PBS	PBS + D - glucose	PBS + N-acétylcystéine	PBS cyclosporine A	PBS + vitamine E
0	100 ± 5,8	100 ± 10,3	100 ± 5,6	100 ± 9,8	100 ± 12,1
10 <sup>-5</sup> M	91,2 ± 5,3	90,3 ± 5,9	97,7 ± 2,1	79,4 ± 3,6	96,1 ± 3,5
5.10 <sup>-5</sup> M	75,4 ± 9,9	80,2 ± 13,1	95,1 ± 2,6	87,4 ± 5,6	88,4 ± 8,5
10 <sup>-4</sup> M	33,6 ± 12,0	41,3 ± 14,9	94,8 ± 2,8	65,9 ± 12,1	88,0 ± 5,0
5.10 <sup>-4</sup> M	28,5 ± 10,7	28,9 ± 8,5	44,7 ± 2,6	44,3 ± 6,8	97,2 ± 3,6
10 <sup>-3</sup> M	26,9 ± 5,8	27,6 ± 3,7	51,5 ± 5,3	44,8 ± 1,8	83,4 ± 2,5
B. Indice de protection	59,2	68,1	80,6	70,3	91,5

Tableau 3.

A. Effet de différentes concentrations en TBHP(M) dilué dans différents milieux :

- PBS seul
- PBS + D - glucose 5 mM
- PBS + N - Acétylcystéine 5 mM
- PBS + Cyclosporine A 5 µM
- PBS + vitamine E 10<sup>-3</sup> M

Pour chaque milieu, les résultats sont exprimés en % par rapport à la quantité des protéines obtenues 2 jours après l'incubation dans du PBS seul

B. Indice d'effet des stress sous TBHP réalisés dans un tampon PBS seul ou additionné de D - glucose, de N - acétylcystéine, de cyclosporine A, de vitamine E.

Les valeurs données sont calculées de cette façon: on calcule la moyenne des pourcentages de protéines obtenus à chaque concentration en éthanol.



Nous avons ensuite réalisé un graphique reprenant les % de protection obtenus avec la cyclosporine A en fonction du % de survie obtenu après le stress sous TBHP ou sous éthanol sans cyclosporine (fig. 25).

Nous observons que le maximum de pourcentage de protection se situe aux environs d'un pourcentage de survie cellulaire similaire, et donc aussi de cytotoxicité similaire, lorsque nous comparons les résultats obtenus après le stress sous TBHP ou sous éthanol.

Pour conclure cette partie sur les effets du métabolisme énergétique (utilisation du D - glucose), des antioxydants (vitamine E et N - acétylcystéine) et du métabolisme calcique mitochondrial (cyclosporine A) sur la survie des cellules confrontées à des stress sous éthanol ou sous TBHP, nous avons repris deux tableaux non seulement récapitulant les résultats obtenus, mais aussi donnant un indice d'effet de chaque condition de stress, avec ou sans D - glucose, vitamine E, N - acétylcystéine ou cyclosporine A (Tableaux 3, 4). Les valeurs de cet indice d'effet sont la moyenne des pourcentages de protéines obtenus à chaque concentration en TBHP ou en éthanol.

En ce qui concerne les stress sous TBHP, nous obtenons un indice d'effet de 68,1 % en présence de D - glucose, ce qui représente 15 % de protection si l'on calcule un pourcentage de protection comme étant le rapport de l'indice d'effet obtenu en présence d'une molécule protectrice et de l'indice d'effet obtenu sans cette molécule.

En présence de l'antioxydant N - acétylcystéine, nous obtenons 36 % de protection alors que nous observons une protection de 55 % en présence de vitamine E, selon le même mode de calcul.

La cyclosporine A, quant à elle, a donné une protection de 19 % quand nous comparons les indices d'effet obtenus avec et sans cyclosporine A.

Dans nos conditions expérimentales, nous pouvons écrire que nous observons surtout un effet protecteur des antioxydants, vitamine E tout d'abord puis N - acétylcystéine, suivi d'un effet protecteur plus faible procuré par la cyclosporine A et d'une protection encore plus faible exercée par le D - glucose.

Dans le cas des stress sous éthanol, le D - glucose procure 43 % de protection, la cyclosporine A exerce une protection de 41 % et la vitamine E une plus faible protection d'environ 20 %. Dans nos conditions expérimentales, nous avons donc trouvé que les fibroblastes exposés à des stress sous éthanol sont très bien protégés par le D - glucose et la cyclosporine, de manière quasi égale pour ces deux molécules. Aucune publication de la littérature ne nous a permis de comparer nos résultats obtenus avec la vitamine E avec des données déjà connues.

A. Concentration en éthanol (%)	PBS	PBS + D - glucose	PBS + Cyclosporine	PBS + vitamine E
0	100 ± 3,4	100 ± 7,9	100 ± 12,3	100 ± 9,9
1,5	64,7 ± 3,4	91,3 ± 5,4	87,8 ± 5,9	88,8 ± 10,7
3	60,2 ± 13,1	86,1 ± 3,3	87 ± 4,1	88,1 ± 3,7
4,5	38,7 ± 4,1	85,6 ± 4,10	76 ± 6,9	46 ± 5,3
6	35,1 ± 2,0	66,4 ± 7,2	70 ± 2,0	44,8 ± 8,5
7,5	37 ± 13,1	51 ± 8,5	53 ± 3,1	36,4 ± 8,7
B. Indice d'effet	55,9	80,1	79,0	67,3

Tableau 4.

A. Effet de différentes concentrations en éthanol dans différents milieux:

- PBS seul
- PBS + D - glucose 5 mM
- PBS + Cyclosporine A 5  $\mu$ M
- PBS + vitamine E  $10^{-3}$  M;

Pour chaque milieu, les résultats sont exprimés en % par rapport à la quantité des protéines obtenue 2 jours après l'incubation du PBS seul .

B. Indice d'effet des stress sous éthanol réalisés dans un tampon PBS seul ou additionné de D - glucose, vitamine E ou cyclosporine A.

Les valeurs données sont calculées de cette façon: on calcule la moyenne des pourcentages de protéines obtenus à chaque concentration en éthanol.



Dans cette première partie, nous avons testé l'effet du métabolisme énergétique, du métabolisme calcique mitochondrial et des antioxydants sur la survie des fibroblastes confrontés à des stress sous éthanol ou sous TBHP.

Dans l'introduction de ce travail, nous avons présenté un modèle thermodynamique de vieillissement cellulaire qui prédisait non seulement que les cellules ont besoin d'énergie pour résister à un stress cytotoxique mais aussi que les cellules ont besoin d'énergie pour résister à un stress plus faible qui accélère leur vieillissement sans les tuer. C'est cette autre prédiction du modèle que nous allons tester dans la suite de ce travail.

## 2. Effet du métabolisme énergétique et des antioxydants sur le vieillissement accéléré provoqué par les stress.

Le modèle du vieillissement *in vitro* des fibroblastes décrit dans l'introduction a été utilisé pour tester la théorie considérant le vieillissement comme étant le passage graduel d'un état stationnaire à un autre, chacun représentant un minimum de production d'entropie (Toussaint O., 1991). Ces cellules passent par sept morphotypes dont les proportions relatives varient en fonction de leurs passages successifs en culture (Bayreuther et al., 1988).

Comme déjà mentionné dans l'introduction, on peut diminuer la durée d'existence d'un état stationnaire en réalisant des fluctuations, appelées stress en biologie cellulaire. Parmi les stress testés, nous avons cité le TBHP et l'éthanol mais aussi les expositions aux rayons U.V. et à la mitomycine C.

Nous avons effectué des stress successifs sous TBHP à  $2,5 \cdot 10^{-5}$  M, conditions où la survie cellulaire n'est pas significativement différente de 100 %. En effet, dans la partie précédente des résultats, nous n'observons aucune mortalité significative à  $5 \cdot 10^{-5}$  M en TBHP, ce qui représente une concentration deux fois plus importante que celle utilisée dans cette partie consacrée aux stress successifs.

5 stress successifs sous TBHP ont été réalisés, avec 1 stress de 1 heure réalisé chaque jour pendant 5 jours. Des études antérieures ont montré que ce délai est nécessaire pour permettre la récupération des cellules après les stress : un délai plus faible entraîne



rapidement la disparition de toute la population cellulaire. Au contraire, si nous attendons trop longtemps avant de réaliser le stress suivant, les cellules de morphotypes jeunes (I et II) reprennent leurs mitoses ce qui fausse le résultat obtenu lorsque nous déterminons les proportions relatives des différents morphotypes : nous risquons alors de surévaluer les proportions de ces morphotypes jeunes à haut potentiel prolifératif.

De manière à tester si un niveau élevé du métabolisme énergétique permet de protéger les cellules confrontées à des stress successifs sous TBHP, nous avons réalisé des séries de stress successifs avec et sans D - glucose à une concentration de 5 mM. Pour tester un éventuel effet des antioxydants, nous avons réalisé des séries de stress successifs avec et sans vitamine E. Nous n'avons pas testé l'effet de la N -acétylcystéine, d'une part par manque de temps, d'autre part parce que nous ne possédions pas encore les résultats de l'effet de la N - acétylcystéine sur la survie des cellules confrontées au TBHP. En effet, les expériences de stress successifs sont très longues : entre le repiquage des cellules et la fin des déterminations des % de morphotypes après le stress, un minimum de 8 jours s'écoule pour les stress sous TBHP et, de 12 jours pour les stress sous éthanol (1 stress tous les 2 jours et dans ce cas 5 fois de suite), sans compter le temps nécessaire à la détermination, sous microscope optique, de la proportion des différents morphotypes.

Il était donc nécessaire de commencer les stress successifs avant d'avoir tous les résultats de cytotoxicité en présence ou non de D - glucose, vitamine E, N - acétylcystéine et la cyclosporine A. Ne possédant encore aucune donnée sur la N - acétylcystéine et la cyclosporine A, nous n'avons pas eu le temps de tester l'effet de ces molécules sur le passage accéléré des fibroblastes par leurs morphotypes successifs lors des stress.

Décrivons à présent les résultats obtenus après les stress successifs de 1 heure sous TBHP  $2,5 \cdot 10^{-5}$  M dilué dans du PBS, additionné ou non soit de D - glucose 5 mM soit de vitamine E 1 mM. Dans le cas des stress en présence de vitamine E, cette molécule a aussi été fournie aux cellules 24 heures avant les stress entre chaque stress et après le dernier stress pour permettre son incorporation dans les membranes biologiques.

Nous ne nous sommes pas contentés de déterminer les proportions des différents morphotypes après stress, nous avons aussi déterminé d'une part le pourcentage total des cellules montrant une activité  $\beta$  - galactosidase associée à la sénescence cellulaire comme **Dimri et al. (1995)** l'ont montré lors de la sénescence normale et comme **Jean Baptiste Mazarati** le montre dans le cas de sénescence accélérée par des stress, dans le cadre de son mémoire de fin de licence, réalisé conjointement à ce travail. D'autre part, nous avons aussi déterminé le pourcentage de cellules montrant cette activité  $\beta$  - galactosidase

% de morphotypes	Témoin	TBHP 2,5.10 <sup>-5</sup> M	TBHP 2,5.10 <sup>-5</sup> M + D-glucose 5mM	TBHP 2,5.10 <sup>-5</sup> M + vitamine E 1mM
I	1,5 ± 2,0	0	0	0
II	49,3 ± 1,6	21,2 ± 5,6	33,8 ± 2,5	42,5 ± 2,6
III	28,8 ± 1,9	50,1 ± 1,1	49,4 ± 6,9	45,8 ± 1,3
IV	19,1 ± 2,7	24,1 ± 2,6	14,7 ± 2,3	11,0 ± 1,1
V	1,3 ± 0,5	4,4 ± 1,9	2,0 ± 1,4	1,0 ± 2,5

Tableau 5. Effet de 5 stress successifs sous TBHP 2,5.10<sup>-5</sup> M dilué dans du PBS, PBS, PBS + D - glucose, PBS + vitamine E, pendant 1 heure, tous les jours. Les résultats sont exprimés en pourcentage de morphotypes. Un minimum de 400 cellules furent comptées dans des quadruples.

% de morphotypes	Témoin	Ethanol 4,5 %	Ethanol 4,5 % + D- glucose 5mM	Ethanol 4,5 % + vitamine E 1 mM
I	1,5 ± 2,0	0	0	0
II	49,3 ± 1,6	17,8 ± 0,0	36,6 ± 2,6	17,8 ± 1,3
III	28,8 ± 1,9	52,6 ± 2,6	51,6 ± 1,4	55,4 ± 2,0
IV	19,1 ± 2,7	27,2 ± 1,0	10,7 ± 2,6	24,9 ± 3,2
V	1,3 ± 0,5	2,1 ± 1,3	13,0 ± 2,5	1,8 ± 0,3

Tableau 6. Effet de 5 stress successifs sous éthanol 4,5 % v/v dilué dans du PBS, PBS + D - glucose, PBS + vitamine E , pendant 2 heures tous les 2 jours. Les résultats sont exprimés en pourcentage de morphotypes. Un minimum de 400 cellules furent comptées dans des quadruples.



associée au vieillissement au sein des populations de chacun des morphotypes successifs. Voici les résultats obtenus.

Nous observons que le pourcentage de morphotypes II n'est pas aussi bas après les stress effectués en présence de D - glucose par rapport aux stress effectués sans D - glucose. Nous observons aussi que l'augmentation de morphotypes IV et V est plus faible si les stress sous TBHP (Tableau 5) sont réalisés en présence de D - glucose. Par rapport aux stress réalisés sous TBHP seul (sans D - glucose), on remarque qu'on reste au même niveau de morphotypes III, ceci n'est pas étonnant puisque moins de cellules sont passées des morphotypes III aux morphotypes IV et V; conduisant ainsi à une plus forte accumulation en morphotypes III qui ne sont pas passés en morphotypes IV ou V. La diminution en pourcentage de morphotypes II étant plus faible d'environ 10 % et l'augmentation en morphotypes IV et V étant aussi plus faible d'environ 10 %, en présence de TBHP + D- glucose, on se retrouve finalement avec le même pourcentage de morphotypes III, que le stress sous TBHP soit réalisé avec ou sans D - glucose. Les résultats obtenus avec vitamine E présentent à la fois un côté intéressant et étrange. D'une part, on conserve une très haute proportion en morphotypes II par rapport au contrôle sans TBHP, ce qui est en faveur d'un effet protecteur de la vitamine E. D'autre part, la proportion de morphotypes IV a aussi diminué en présence de vitamine E : ces résultats suggèrent qu'une partie de ces morphotypes IV ont disparu sous l'intensité du stress, car rappelons-le, les cellules âgées sont beaucoup plus sensibles aux stress, et ces morphotypes IV morts n'ont pas été remplacés par des nouveaux morphotypes IV apparus après transition à partir de cellules plus jeunes, d'où accumulation de cellules de morphotype III, dont la transition vers les morphotypes IV et V a été empêchée par la vitamine E.

En conclusion, nous trouvons ici un effet protecteur à la fois du D - glucose et de la vitamine E, les résultats les plus spectaculaires concernant cette protection étant obtenus par la vitamine E. Nous obtenons le même ordre d'importance entre les effets protecteurs du D - glucose et de la vitamine E sur la mortalité cellulaire et la transition vers des morphotypes plus âgés.

Concernant les effets de 5 stress successifs sous éthanol à 4,5 % v/v (Tableau 6) sur l'évolution des pourcentages de morphotypes, nous observons une très forte diminution des cellules de morphotypes II corrélée à une augmentation importante des cellules de morphotypes III et IV, ces résultats étant comparables à ceux obtenus après 5 stress successifs sous TBHP  $2,5.10^{-5}$  M.





Figure 26. Illustration de la coloration spécifique montrant l'activité  $\beta$  - galactosidase des cellules sénescents (Dimri et al., 1995). (grossissement 200 fois).



En comparaison des effets cytotoxiques du TBHP à  $2,5 \cdot 10^{-5}$  M, nous sommes ici dans des conditions où la mortalité cellulaire est plus élevée. Nous n'avions pas encore les résultats de la cytotoxicité lorsque nous avons commencé les effets des stress successifs sur le passage accéléré par les différents morphotypes. Cependant, des études antérieures ont montré que lorsque la cytotoxicité d'un stress augmente, on observe tout d'abord la mort des morphotypes âgés avant celle des jeunes comme c'est le cas par exemple lorsque les cellules âgées sont soumises à la trypsinisation. Autrement dit, tout ce que nous risquions, en utilisant un stress plus cytotoxique, était de faire une sous-évaluation des pourcentages de cellules de morphotypes âgés. Donc les résultats que nous avons obtenus, sont très intéressants car, malgré que des cellules de morphotypes plus âgés soient mortes à cause du stress, on note tout de même leur augmentation à la suite des stress successifs sous éthanol seul (sans D - glucose ou vitamine E) : une transition vers des cellules plus âgées a donc lieu, nous permettant ainsi de dégager des effets protecteurs du D - glucose ou de la vitamine E. Des expériences, où la concentration en éthanol serait plus faible, doivent cependant être effectuées pour confirmer cette conclusion définitivement. En conclusion, nous retrouvons bien un effet protecteur du D - glucose contre le passage accéléré des cellules à des morphotypes plus âgés lors de stress sous TBHP ou éthanol.

De manière à avoir un deuxième critère de comparaison, nous avons déterminé le pourcentage de cellules présentant une coloration spécifique à la sénescence matérialisant la présence d'une activité  $\beta$  - galactosidase à pH 6,0 spécifique à la sénescence (fig.26). Débutons par les résultats obtenus après 5 stress successifs sous TBHP  $2,5 \cdot 10^{-5}$  M effectués comme précédemment, en présence ou non de D - glucose ou de vitamine E. Premièrement, nous observons (Tableau 5) que 36,1 % des cellules sont colorées après le stress alors que seulement 24,2 % des cellules contrôles le sont. La vitamine E et le D - glucose procurent une protection très semblable, on obtient respectivement 30,0 et 30,1 % de cellules colorées. Si l'on considère qu'on a une augmentation de 11,9 % de cellules colorées par les cellules stressées sous TBHP seul, cette augmentation n'est que de 5,8 % et 5,3 % en présence respectivement de vitamine E ou de D - glucose, soit une protection de 50 % environ  $[100 - (5,9 / 11,9) \times 100]$  %.

Les pourcentages bruts de cellules colorées pour chaque morphotype, c'est-à-dire calculés par rapport au nombre total de cellules de la population considérée, tous morphotypes confondus, sont très peu informatifs (Tableau 7, colonne 2) car ces chiffres dépendent aussi de la proportion des morphotypes eux-mêmes, c'est pour cette raison

	% de morphotypes	% de cellules colorées par rapport au nombre total de cellules.	% de cellules colorées par rapport au nombre de cellules de chaque morphotype considéré comme 100 %
<b>Témoins</b>			
<b>Morphotypes I</b>	1,5 ± 2,0	0	0
<b>II</b>	49,3 ± 1,6	6,2	12,7 ± 5,8
<b>III</b>	28,8 ± 1,9	10,5	36,6 ± 3,1
<b>IV</b>	19,1 ± 2,7	6,9	35,2 ± 1,1
<b>V</b>	1,4 ± 0,5	0,6	46,6 ± 5,6
<b>Total des cellules colorées : 24,2 % ± 2,7</b>			
<b>TBHP</b>			
<b>Morphotypes I</b>	0	0	0
<b>II</b>	21,2 ± 5,6	6,6	31,1 ± 1,2
<b>III</b>	50,1 ± 1,1	19,0	38,0 ± 11,3
<b>IV</b>	24,1 ± 2,6	7,6	31,5 ± 2,1
<b>V</b>	4,4 ± 1,9	2,9	66,5 ± 5,6
<b>Total des cellules colorées : 36,1 % ± 3,3</b>			
<b>TBHP + D - glucose</b>			
<b>Morphotypes I</b>	0	0	0
<b>II</b>	33,8 ± 2,5	7,9	23,5 ± 2,1
<b>III</b>	49,4 ± 6,9	16,5	33,6 ± 0,5
<b>IV</b>	14,7 ± 2,3	3,9	26,4 ± 6,7
<b>V</b>	2,0 ± 1,4	1,8	90,5 ± 0,7
<b>Total des cellules colorées : 30,1 % ± 2,5</b>			



TBHP + vitamine E				
Morphotypes	I	0	0	0
	II	42,5 ± 2,6	6,9	16,3 ± 1,2
	III	45,8 ± 1,3	17,3	37,8 ± 1,1
	IV	11,0 ± 1,1	5,0	45,4 ± 2,1
	V	1,0 ± 2,5	0,8	85,0 ± 0,2

**Total des cellules colorées : 30,0 % ± 4,2**

Tableau 7 : Effet de stress successifs sous TBHP  $2,5 \cdot 10^{-5}$  M dilué dans du PBS,

PBS + D - glucose, PBS + vitamine E, pendant 1 heure tous les jours.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de morphotypes, en pourcentage de cellules colorées par rapport au nombre total de cellules et en pourcentage de cellules colorées par rapport au nombre de cellules de chaque morphotype considéré comme 100 %;

Un minimum de 400 cellules dans des quadruples furent comptées.

	% de morphotypes	% de cellules colorées par rapport au nombre total de cellules.	% de cellules colorées par rapport au nombre de cellules de chaque morphotype considéré comme 100 %
<b>Témoins</b>			
<b>Morphotypes</b> I	1,5 ± 2,0	0	0
II	49,3 ± 1,6	6,2	12,7 ± 5,8
III	28,8 ± 1,9	10,5	36,6 ± 3,1
IV	19,1 ± 2,7	6,9	35,2 ± 1,1
V	1,4 ± 0,5	0,6	46,6 ± 5,6
<b>Total des cellules colorées : 24,2 % ± 2,7</b>			
<b>Ethanol</b>			
<b>Morphotypes</b> I	0	0	0
II	17,8 ± 0	5,0	28,6 ± 2,3
III	52,6 ± 2,6	19,6	37,4 ± 8,5
IV	27,2 ± 1,0	13,3	49,1 ± 2,1
V	2,1 ± 1,3	18,2	86,6 ± 4,7
<b>Total des cellules colorées : 56,1 % ± 3,7</b>			
<b>Ethanol + D - glucose</b>			
<b>Morphotypes</b> I	0	0	0
II	36,6 ± 2,6	7,4	20,3 ± 7,5
III	51,6 ± 1,4	17,0	33,1 ± 0,2
IV	10,7 ± 2,6	4,0	37,5 ± 3,2
V	1,3 ± 2,5	1,0	87,0 ± 2,0
<b>Total des cellules colorées : 29,5 % ± 3,5</b>			

Ethanol + vitamine E				
Morphotypes	I	0	0	0
	II	17,8 ± 1,3	7,8	43,9 ± 1,0
	III	55,4 ± 2,0	25,0	45,1 ± 0,6
	IV	24,9 ± 3,2	16,2	65,0 ± 0,8
	V	1,8 ± 0,3	1,7	95,0 ± 0,6

Total des cellules colorées : 50,7 % ± 2,1

Tableau 8 : Effet de stress successifs sous éthanol 4,5% v/v dilué dans du PBS,

PBS + D - glucose, PBS + vitamine E, pendant 2 heures tous les 2 jours.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de morphotypes, en pourcentage de cellules colorées par rapport au nombre total de cellules et en pourcentage de cellules colorées par rapport au nombre de cellules de chaque morphotype considéré comme 100 %;

Un minimum de 400 cellules dans des quadruples furent comptées.



que nous avons calculé (Tableau 7, colonne 3) la proportion de cellules marquées pour chaque morphotype exprimée en considérant le nombre de chaque morphotype comme 100 %. Nous notons une augmentation de la proportion de cellules marquées dans le morphotype II (on passe de 12,7 à 31,1 %), et cette augmentation est plus faible en présence de D - glucose ou de vitamine E. On ne note pas de changement significatif pour les proportions de morphotypes III ou IV colorés par rapport au nombre de morphotypes III considérés comme 100 %. Quant aux morphotypes V, leur proportion est beaucoup trop faible que pour pouvoir tirer des informations de leurs proportions relatives entre les différents traitements des cellules. Concernant les effets de 5 stress successifs sous éthanol 4,5 % v/v avec un stress réalisé tous les 2 jours, nous observons aussi une augmentation de la proportion totale des cellules colorées présentant donc une activité  $\beta$  - galactasidase spécifique à la sénescence cellulaire.

On passe de 24,2 % dans le témoin à 56,1 % en présence d'éthanol (différence de 31,9 %) . Le D - glucose procure une protection très importante : on n'a que 29,5 % de cellules colorées (différence de 5,3 % par rapport aux témoins, ce qui donne  $[100 - (5,3/31,9) \times 100] = 100 - 16,3 \% = 83,7 \%$  de protection.

La protection offerte par la vitamine E est nulle, on a plus de cellules colorées en présence de vitamine E. Lorsqu'on compare les pourcentages de cellules de chaque morphotype comme 100 % (Tableau 8, colonne 3), on obtient 12,7 % de cellules de morphotype II qui sont marquées par rapport au nombre de morphotype II dans la population témoin, alors que cette valeur monte à 28,6 % après les stress sous éthanol. En présence de D - glucose, on reste à 20,3 % de cellules marquées, alors qu'en présence de vitamine E, cette valeur grimpe à 43,9 %. Les valeurs observées pour les morphotypes III sont très proches, sauf en présence de vitamine E : on passe de valeurs situées entre 33,1 % et 37,0 % à une valeur de 45,1 % en présence de vitamine E. Des tendances remarquables se dégagent des valeurs obtenues pour les morphotypes IV : on reste très proche des contrôles en présence de D - glucose (valeurs contrôles;  $35,2 \pm 1,1\%$ ), valeurs éthanol + D - glucose :  $37,5 \pm 3,2 \%$ ), alors qu'en présence d'éthanol seul ou d'éthanol + vitamine E, on a des valeurs respectives de 49,1 et de 65 %. Le nombre absolu de morphotypes V est beaucoup trop faible que pour pouvoir tirer des renseignements de leurs proportions en cellules colorées.

Ces résultats confirment le rôle protecteur du glucose dans les 2 situations de stress : TBHP ou éthanol.

Un rôle protecteur très net de la vitamine E est observé lors des stress sous TBHP, alors qu'on ne le retrouve pas après les stress sous éthanol. Des expériences complémentaires en présence de N - acétylcystéine pourraient donc plus que jamais aider à décider si le rôle de la vitamine se fait par ses propriétés antioxydatives ou par ses propriétés pro-prolifératives observées par ailleurs (Michiels, 1990).

### 3. Etude de la respiration au cours du vieillissement.

Les parties précédentes du travail étaient consacrées à tester si le métabolisme énergétique peut protéger les fibroblastes d'une part contre un stress létal et d'autre part contre leur passage accéléré lors de stress de moindre intensité.

Une autre prédiction du modèle thermodynamique présenté dans l'introduction est, qu'au cours de leur vieillissement, les cellules vont connaître une baisse de leur production d'énergie libre utilisable par la cellule, autrement dit une baisse du niveau de turn-over de l'ATP à partir d'ADP. Nous avons aussi mentionné dans l'introduction que cette diminution de reproduction d'énergie libre utilisable par la cellule peut être attribuée à deux facteurs principaux. Le premier étant une diminution en soi des possibilités de régénérer l'ATP par la glycolyse (cytoplasmique) ou les phosphorylations oxydatives (mitochondriales).

Le second facteur étant une modification de paramètres extérieurs à ces voies métaboliques en tant que telles, comme par exemple un effet de modification de la fluidité membranaire sur les transporteurs de glucose, une diminution de l'activité spécifique de ces transporteurs, une augmentation des besoins en ATP de la cellule pour réparer des dommages dont l'accumulation ne cesse de croître avec le vieillissement ou pour refouler certains ions comme le calcium.

Pour approcher ce problème complexe, nous avons choisi, de manière préliminaire, de mesurer la consommation d'oxygène de fibroblastes dont la membrane plasmique et les membranes mitochondriales externes ont une perméabilité accrue et ce, afin d'éliminer les problèmes par exemple de diffusion, vitesse de transport ou de consommation d'ATP par les pompes calciques différentielles au cours du vieillissement. La stratégie étant d'ajouter des inhibiteurs des pompes calciques, comme des ions vanadate, et des inhibiteurs de la glycolyse, comme l'iodoacétate, et de fournir aux cellules l'ADP et du



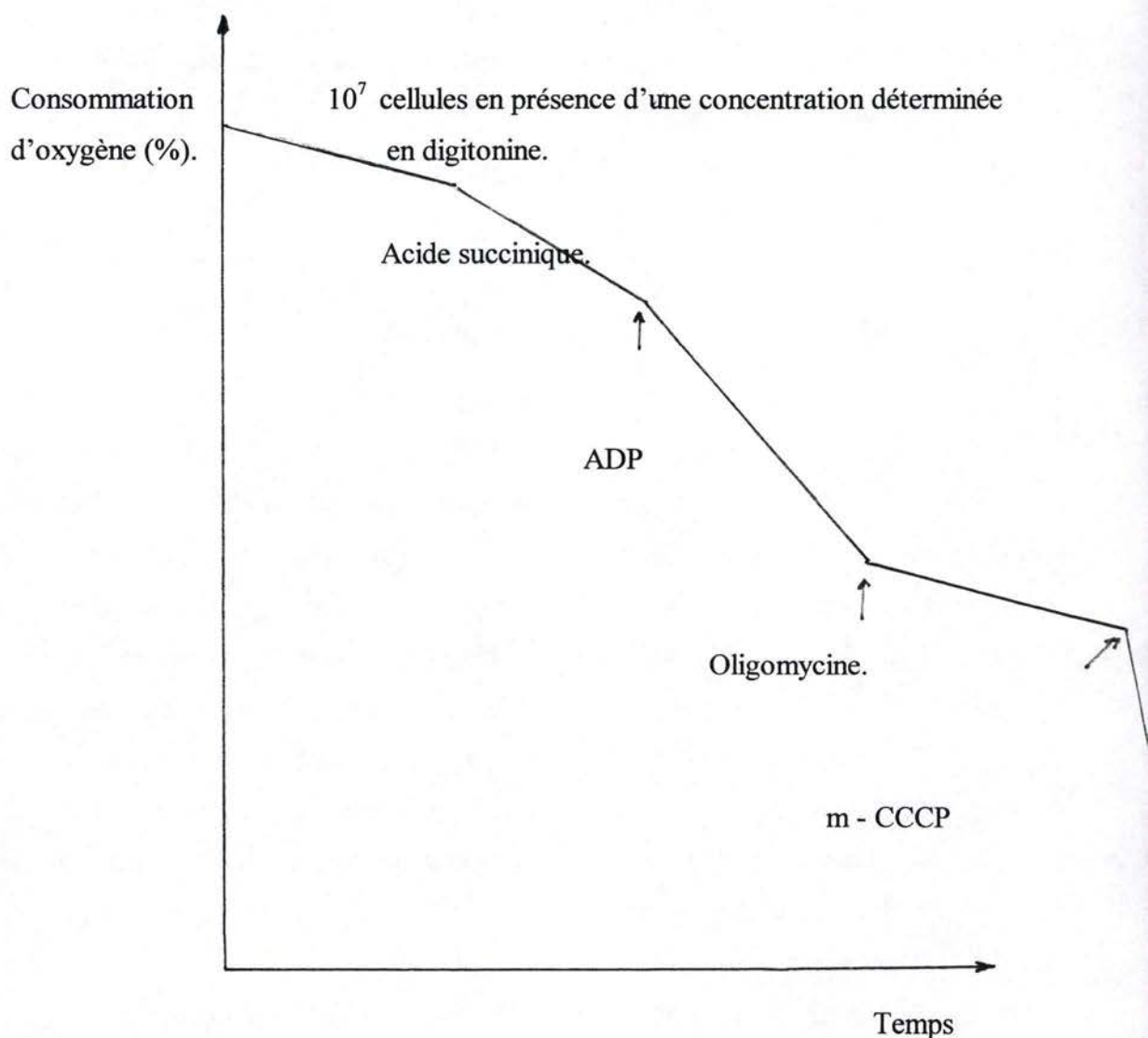


Figure 27. Mesure de paramètres respiratoires.

Différents essais sont réalisés en présence de diverses concentrations finales en digitonine.

Seront ajoutés successivement : de l'acide succinique 5 mM durant 4 minutes, ADP 2 mM durant 3 minutes, de l'oligomycine 2  $\mu\text{g/ml}$ , du m - CCCP 0,2  $\mu\text{M}$ .

Le rapport entre la vitesse en présence d'ADP et la vitesse en présence d'acide succinique, nous permet de calculer l'index RC (« Respiratory Control »), le rapport entre la vitesse en présence de l'agent découplant m - CCCP et la vitesse en présence d'oligomycine nous indiquera un index URC (« Uncoupled Respiratory Control »).

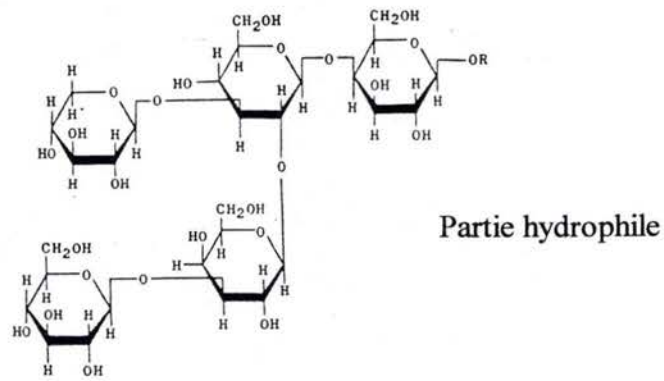


succinate dans le but de mesurer la consommation d'oxygène des cellules lors de leur respiration.

Une collaboration avec le laboratoire de bioénergétique de l'Université de Liège, établie grâce à un projet FRFC courant de 1997 à 2 000, nous a permis de connaître les paramètres principaux permettant de réaliser ces expériences, comme par exemple les concentrations ioniques du tampon permettant d'observer la respiration mitochondriale dans des cellules dont la membrane plasmique et les membranes mitochondriales internes ont été préalablement perméabilisées à l'aide d'une concentration adéquate en digitonine. Ce procédé a déjà été utilisé avec succès sur plusieurs types cellulaires comme par exemple des lignées de cellules de neuroblastomes humains ou des cellules d'épithélium de poumons humains.

Dans le cadre de notre travail sur le vieillissement, nous avons réalisé une étude préalable qui nous permettra de déterminer non seulement la consommation mitochondriale d'oxygène mais aussi les stades 3 et 4 de la respiration, ainsi que des paramètres jouant sur le contrôle respiratoire. Le but de cette partie du travail est donc de mesurer ces paramètres respiratoires au cours des passages en culture des fibroblastes WI - 38. Chaque paramètre mesuré est indicateur de l'état des mitochondries de même que certains rapports comme le rapport entre les vitesses de consommation d'oxygène en présence d'ADP et en son absence, qui permet de calculer l'index RC (« Respiratory Control »). La vitesse de consommation d'oxygène en présence d'oligomyeine ( $V_{\text{olig}}$ ) qui est un inhibiteur spécifique de l'ATP synthétase nous renseigne sur la perméabilité membranaire aux protons. La vitesse en présence de m - CCP ( $V_{\text{m-ccp}}$ ), agent découplant est, quant à elle, un indicateur du flux maximum d'électrons dans la chaîne respiratoire. Le rapport  $V_{\text{m-ccp}} / V_{\text{oligomyeine}}$  permet de calculer l'index respiratoire à l'état découplé (URC : « Uncoupled Respiratory Control ») (fig. 27 ).

La glycolyse et le cycle de Krebs sont les voies cataboliques dégradant le glucose et d'autres combustibles apparentés. La glycolyse a lieu dans le cytosol et dégrade le glucose en 2 molécules de pyruvate qui seront transportées dans la matrice mitochondriale où le cycle de Krebs va continuer sa dégradation en  $\text{CO}_2$  et en fournissant du potentiel réducteur sous forme de NADH et de  $\text{FADH}_2$ , potentiel qui sera utilisé lors des phosphorylations oxydatives générant l'ATP.



R = digitogenin

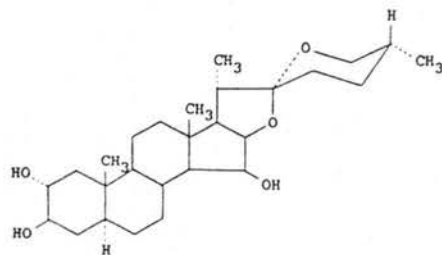


Figure 28. Structure de la molécule amphipatique de digitonine.

Cette molécule comporte une région hydrophile et une région hydrophobe qui va interagir avec la région hydrophobe du cholestérol se trouvant dans les membranes biologiques.

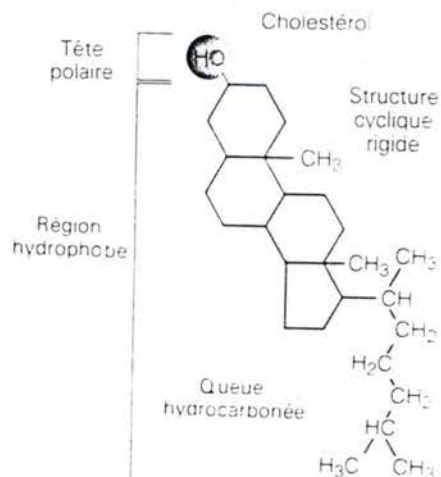


Figure 29. Structure de la molécule de cholestérol.



### 3.1. Perméabilisation des fibroblastes WI - 38.

Afin de perméabiliser ces cellules, nous avons utilisé la digitonine (fig. 28). La digitonine est un détergent qui, à faible concentration, se lie spécifiquement à la molécule de cholestérol (fig. 29) dans un rapport 1/1 par interactions hydrophobes. L'effet de la digitonine est de modifier la perméabilité de la membrane plasmique et de la membrane externe des mitochondries afin de faciliter l'entrée dans la cellule à la fois du succinate et de l'ADP. A concentration plus élevée, la digitonine agit comme détergent en tant que tel et il y aura formation de micelles avec les phospholipides des membranes. Pour tout détergent, on définit une concentration micellaire critique (CMC), c'est à dire concentration à laquelle les micelles apparaissent; le CMC est propre à chaque détergent et dépend de la structure de ses régions hydrophobes et hydrophiles. Différentes concentrations seront testées afin d'obtenir un optimum de perméabilisation tout en conservant une consommation d'oxygène maximale par les mitochondries. Les expériences furent d'abord réalisées sur cellules vieilles (passage en culture 39, 40 et 41) ensuite sur cellules jeunes (passage en culture 29, 30 et 31) afin de pouvoir établir une comparaison.

### 3.2. Protocole d'essais.

Les essais ont été réalisés sur  $10^7$  cellules placées dans une cellule d'incubation thermostatée à 37°C et d'un volume de 1,6 ml. Une température de 37°C est nécessaire pour observer une consommation d'oxygène, comme l'ont montré nos études préliminaires. Décrivons, à présent, les résultats obtenus.

### 3.3. Résultats.

Nous avons commencé par étudier l'effet de la concentration en digitonine sur la consommation d'oxygène des fibroblastes. D'abord, nous avons réalisé cette étude sur des cellules âgées ayant accompli plus de 90 % de leur durée de vie *in vitro*, soit à un nombre de passages en culture supérieur à 40.

Nous avons utilisé la digitonine à 20  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 125  $\mu$ M, 150  $\mu$ M, ces concentrations étant celles présentes dans la cuvette de 1,6 ml dans laquelle les essais étaient effectués. Après avoir ajouté la digitonine, le succinate et l'ADP, nous avons observé une consommation d'oxygène donnant un RC (« Respiratory Control »)



égal à 1,8 (pour une concentration finale de 75  $\mu$ M en digitonine) (voir annexe 1). Après cette expérience encourageante, nous avons voulu la reproduire à partir de jeunes cellules, toutefois sans succès. Alors que le succinate donnait lieu à une faible augmentation de la consommation d'oxygène, aucune augmentation supplémentaire de celle-ci n'était observée quand l'ADP était ajouté.

### 3.4. Tentatives d'explication.

#### 3.4.1. ADP.

Tout d'abord, nous avons utilisé un ADP (**Sigma, U.S.A.**) dont la pureté et la stabilité dans le temps étaient supérieures à l'ADP (**Boehringer, Allemagne**) précédemment utilisé (contamination plus faible en AMP et ATP). Le nouvel ADP utilisé n'a pas donné de meilleurs résultats.

#### 3.4.2. Osmolarité du milieu de resuspension .

Par définition, l'osmolarité représente la concentration totale de solutés en solution ( exprimée en milliosmole / kg de solution ).

L'osmolarité d'une solution peut être due à deux causes générales donnant lieu à des effets différents lors de la mise en présence d'une membrane semi-perméable (dans notre cas, les membranes plasmiques perméabilisées). Premièrement, lorsque l'on place des molécules chargées électriquement, des ions, dans un des compartiments séparés par cette membrane semi-perméable, un flux d'ions aura lieu de manière à ce que la charge électrique se répartisse de manière égale de part et d'autre de cette membrane, atteignant ainsi un équilibre thermodynamique. Deuxièmement, des molécules non chargées tendront aussi à se répartir de part et d'autre de cette membrane pour atteindre cet équilibre. Il est clair que l'effet de la digitonine sur l'osmolarité du tampon utilisé lors des essais de respiration pourrait se classer dans cette seconde catégorie puisque cette molécule n'est pas chargée.

Que cela soit à partir de molécules chargées ou pas, la présence de molécules dans la solution aura pour effet d'abaisser sa température de congélation. Cette méthode de mesure de la température de congélation a été utilisée pour mesurer l'effet de la digitonine sur l'osmolarité.

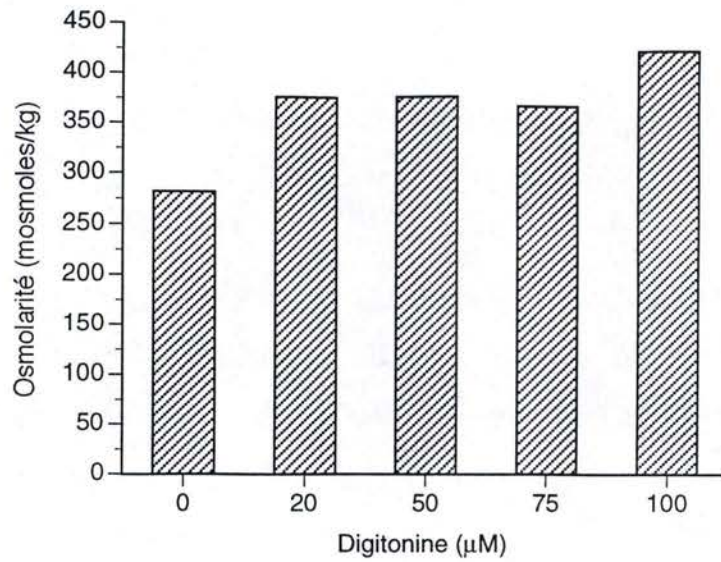


Figure 30. Effet de la digitonine sur l'osmolarité du milieu de resuspension.  
Des concentrations croissantes en digitonine ont été ajoutées au milieu de resuspension des cellules utilisé lors des essais de mesure de respiration.

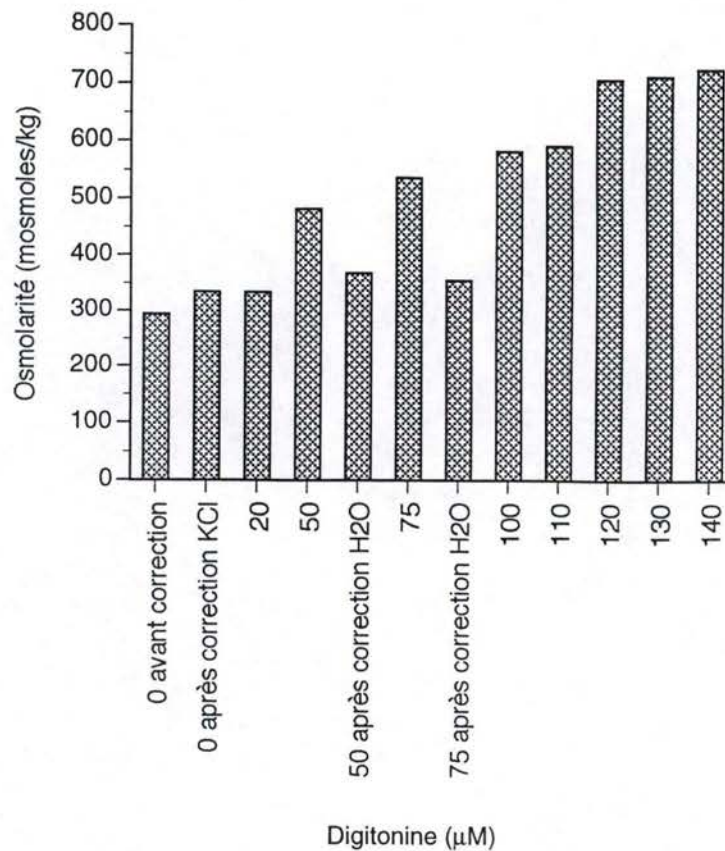


Figure 31. Effet de la digitonine sur l'osmolarité du milieu de resuspension dont l'osmolarité fut corrigée avec du KCl .

Des concentrations finales en digitonine (20, 50, 75, 100, 110, 120, 130, 140 µM) ont été ajoutées au milieu de resuspension (corrigé avec du KCl .

Ayant obtenu des valeurs élevées de mesure d'osmolarité en présence de digitonine, l'osmolarité du milieu de resuspension (corrigé au KCl) fut modifiée avec de l'eau afin d'obtenir une valeur de 300 mosm./ kg.



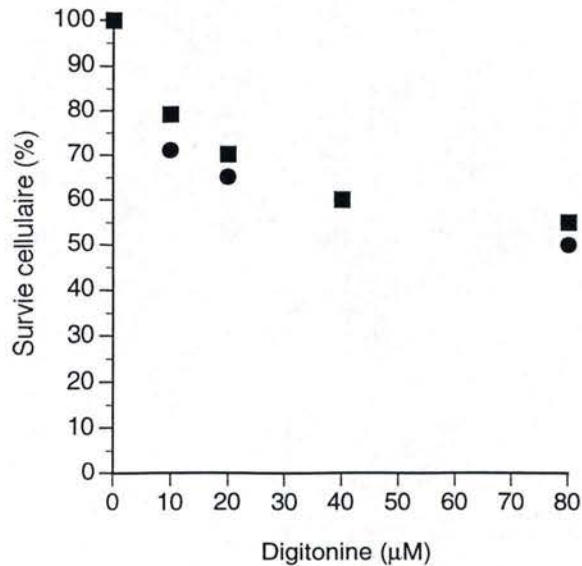


Figure 32. Effet de la digitonine sur la survie cellulaire.

Des fibroblastes ont été incubés durant 2 minutes (carrés) ou 13 minutes (cercles) en présence de concentrations croissantes en digitonine. Un test de survie utilisant les colorants vitaux bromure d'éthidium/ acridine orange a été réalisé. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules survivantes en fonction des concentrations en digitonine.

On sait que l'osmolarité permettant la survie des cellules est voisine de 300 à 330 milliosmoles / kg.

Nous ne comprenions pas à ce moment pourquoi de faibles concentrations en digitonine pourraient avoir un effet sur l'osmolarité. Cependant, les mesures d'osmolarité ont montré que l'ajout de la solution diluée de digitonine augmentait l'osmolarité (milieu corrigé et non corrigé du KCl) (fig. 30,31 ). Ayant obtenu les valeurs d'osmolarité du milieu de resuspension (corrigée avec KCl) en présence de digitonine, nous avons corrigé l'osmolarité avec de l'eau afin d'obtenir une valeur de 330 mosm./kg.

Nous avons alors compris que le problème provenait sans doute du fait que nous diluions la digitonine dans de l'éthanol, ce qui modifie le point de congélation.

#### 3.4.3. Composition du milieu de resuspension.

Ce milieu avait déjà été testé sur d'autres types cellulaires également dans le but de mesurer une consommation d'oxygène.

Ici, afin de mesurer la consommation en oxygène et la sensibilité de l'appareil de mesure ( oxypolarigraphe ) dans notre tampon utilisé, nous avons purifié des mitochondries de rats, resuspendues dans le milieu de resuspension, et effectué une mesure de consommation d'oxygène à la fois dans notre milieu de resuspension et dans un autre milieu utilisé habituellement au laboratoire pour les mitochondries de rats, en présence de succinate, ADP à des concentrations inférieures à celles utilisées sur cellules entières. Les résultats obtenus sont comparables dans les 2 milieux. Le milieu de resuspension utilisé ne s'avère pas néfaste aux fonctionnements des mitochondries isolées.

#### 3.4.4. Tests de « survie cellulaire ».

Afin de connaître l'effet de différentes concentrations en digitonine sur la survie cellulaire, nous avons utilisé la méthode de coloration (aéridine orange / bromure d'éthidium décrite par **Parks et al., 1979**) (cf. 5 .1. Matériels et méthodes).

Les résultats ont été exprimés en pourcentage de cellules survivantes en fonction de la concentration en digitonine (fig. 32).

Pour une concentration en digitonine de 80  $\mu$ M, on observe encore 55% de cellules colorées en vert et donc potentiellement vivantes.

Cependant, la membrane nucléaire possède du cholestérol donc, la digitonine utilisée pour perméabiliser les cellules pourrait atteindre l'intérieur du noyau. Ce dont on est sûr,



c'est que les cellules perméabilisées (qu'elles soient mortes ou uniquement perméabilisées par la digitonine) sont oranges.

Le but de ces expériences était d'obtenir des mitochondries en état de respirer, donc présentant une membrane interne intacte. Nous avons donc recherché des critères biochimiques qui seraient en faveur de cette intégrité des mitochondries. Deux critères ont été choisis : il s'agit d'une part, de la comparaison de l'activité d'une enzyme située dans la matrice mitochondriale : la succinate déshydrogénase et d'autre part, de la fluorescence de la rhodamine 123 qui apparaît lorsque les membranes mitochondriales internes conservent leur potentiel de membrane à une valeur permettant les gradients électrochimiques conduisant à la synthèse d'ATP. Dans le cadre de ce travail, nous avons pris le temps d'étudier surtout les modifications d'activité de la succinate déshydrogénase et nous avons commencé à mettre au point le test de la rhodamine 123 dans les cellules perméabilisées.

#### 3.4.5. Méthode au MTT (cf. 5.2. Matériels et méthodes).

Voyons les résultats obtenus en ce qui concerne l'activité de la succinate déshydrogénase. Rappelons brièvement la méthode au MTT. Lorsque les cellules sont incubées 2 heures avec cette molécule, elle entre dans les mitochondries où le succinate déshydrogénase la clive en son dérivé formazan insoluble, colorant ainsi les cellules en bleu. Après plusieurs rinçages et lyse des cellules, on peut donc mesurer une absorbance au spectrophotomètre à 595 nm ; l'intensité de l'absorbance étant fonction du nombre de cellules. Les cellules sont repiquées à une densité suffisamment faible que pour se situer dans la zone de linéarité existant entre le nombre de cellules et l'absorbance. Lorsque les cellules sont confrontées à un agent cytotoxique à concentration suffisante que pour provoquer la mort cellulaire et donc la lyse de la cellule et de ses organites, comme par exemple les mitochondries, les rinçages éliminent le dérivé formazan insoluble faisant diminuer l'absorbance à 595 nm.

Nous avons mesuré l'absorbance du MTT après les traitements des cellules suivants :

- 1) cellules incubées dans du milieu de culture BME + 10 % de sérum bovin.
- 2) cellules incubées dans du milieu de resuspension.
- 3) cellules incubées dans du milieu de resuspension en présence de différentes concentrations finales en digitonine ( 20  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M, 100  $\mu$ M et 125  $\mu$ M).
- 4) cellules incubées dans du milieu de resuspension dont l'osmolarité est corrigée avec de l'eau afin d'atteindre une osmolarité de 330 mosm. /kg après ajout de digitonine.



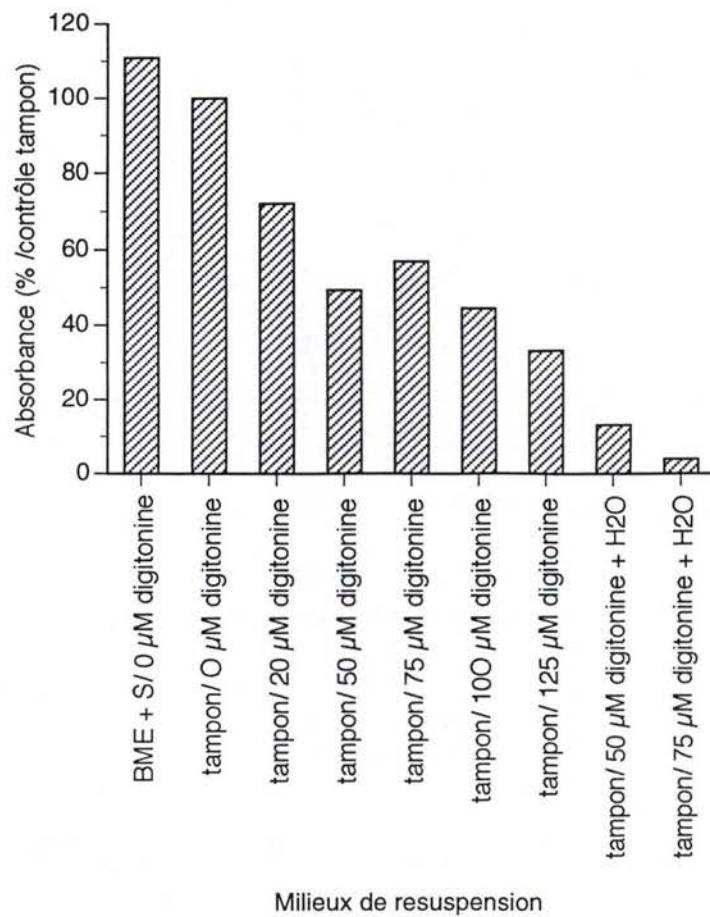


Figure 33. Mesure de l'absorbance (à 595 nm) après incubation des cellules au MTT ayant subi divers traitements : cellules dans du milieu de culture BME + 10 % de sérum bovin, cellules dans du milieu de resuspension, cellules dans du milieu de resuspension en présence de différentes concentrations en digitonine (20, 50, 75, 100 et 125 µM), cellules dans du milieu de resuspension dont l'osmolarité est corrigée avec de l'eau afin d'atteindre une osmolarité de 330 mosm./kg après ajout de digitonine.

Les résultats sont exprimés en % d'absorbance par rapport aux cellules incubées dans un milieu de resuspension seul (fig. 33)

On constate une meilleure activité de l'enzyme succinate déshydrogénase lorsque les cellules sont incubées en présence de BME + sérum bovin SB 10 % par rapport à une incubation dans du milieu de resuspension. Une différence d'environ 10 % est observée, ce qui suggère que les cellules les plus fragiles sont lysées en étant incubées dans ce milieu de resuspension. De plus, lorsque la concentration en digitonine augmente, l'absorbance diminue, montrant ainsi que plus de mitochondries sont lysées par ce traitement à la digitonine. Enfin, le fait de diminuer l'osmolarité du milieu de resuspension à des valeurs plus physiologiques a pour conséquence de tuer plus de 90 % des cellules. L'osmose est par définition le mouvement d'eau à travers une membrane semi-perméable séparant deux solutions présentant des concentrations inégales en solutés. L'eau diffusera de la solution la moins concentrée vers la solution la plus concentrée.

Nous ne pouvions diminuer l'osmolarité avec une solution de KCl car celle-ci aurait eu pour effet d'augmenter l'osmolarité en augmentant la concentration en sels. Rappelons que nous sommes ici en présence de deux facteurs jouant sur l'osmolarité: d'une part des ions salins dont la cellule a besoin pour son équilibre osmotique et d'autre part, des molécules organiques (éthanol et digitonine).

Si l'osmolarité baisse bien par l'ajout d'eau, on atteindrait par contre des concentrations trop faibles en sels. Pour compenser cette diminution de concentration extracellulaire en sels, les cellules ont vu leur concentration en sels à l'intérieur des cellules diminuée, ceci conduisant à leur mort. Cela pourrait expliquer les faibles valeurs d'absorbance obtenues après correction de l'osmolarité avec de l'eau.

Nous avons commencé à mettre au point la détection de la fluorescence de la rhodamine 123 lorsque les cellules sont mises en présence de digitonine. Cette expérience, d'apparence simple, est en fait assez complexe et nécessite une grande quantité de cellules car non seulement, il faut que la digitonine soit présente à la bonne concentration avant d'observer les cellules en microscopie fluorescente mais il faut conserver un bon rapport entre la digitonine et la quantité de cellules. La digitonine doit être ajoutée sur  $10^7$  cellules, comme dans les expériences de mesure de la consommation d'oxygène sur des cellules préincubées pendant 30 minutes avec de la rhodamine avant leur trypsinisation car nous ne pouvons nous permettre de pré-incuber des fibroblastes en suspension pendant 30 minutes avec de la rhodamine car les cellules en suspension



deviennent rapidement très sensibles à toute modification de leur environnement. Toute une mise au point est donc nécessaire et serait coûteuse en temps dont nous ne disposons pas. Il n'est donc pas étonnant que, dans les conditions expliquées ci-dessus, un premier essai de marquage de cellules attachées dans une boîte de culture à la rhodamine en présence de digitonine, n'ait pas donné de résultats positifs.

Ayant modifié la densité cellulaire, la concentration en digitonine, la température, la concentration saline du tampon, la concentration finale en éthanol, nous nous sommes demandé si nos molécules jeunes pouvaient réellement respirer. La respiration des cellules jeunes était-elle inhibée, leur glycolyse en présence de glucose 5mM ne suffit-elle déjà pas à leur assurer une production suffisante en énergie ? Nous avons alors projeté toute une série d'expériences : cultiver les cellules en présence de glutamine de manière à court-circuiter la glycolyse et à fournir directement des intermédiaires du cycle de Krebs, mesurer la consommation d'oxygène en présence d'un inhibiteur de la glycolyse, l'iodo-acétate et / ou après remplacement de l'utilisation de digitonine par une homogénéisation douce au Dounce, qui respecte l'intégrité des mitochondries.

N'ayant pas le temps de nous lancer dans cet ambitieux programme, nous nous sommes résolus à effectuer une première expérience, à savoir incuber des cellules jeunes en présence d'un découplant mitochondrial et, sans digitonine, mesurer leur consommation d'O<sub>2</sub>, et ce de manière à savoir si les mitochondries des fibroblastes jeunes sont bien fonctionnelles. Si c'est le cas, cela vaudra alors la peine d'effectuer les expériences citées juste ci-dessus.

#### 3.4.6. Implications de l'état de confluence.

D'après un article paru en 1982 ( Goldstein et al.), il y aurait une relation entre la consommation en glucose, production de lactate et le fait que les cellules soient à la confluence ou à la mi-confluence. Une comparaison fut établie entre cellules vieilles et jeunes.

Par rapport aux cellules jeunes à mi-confluence, les cellules jeunes à confluence connaissent une diminution de 32 % de la consommation en glucose, une diminution de 44 % de la production de lactate et une diminution de la concentration en ADP, ATP.

Par rapport aux cellules vieilles à mi-confluence, les cellules vieilles à confluence voient une augmentation de 11 % de la consommation en glucose, une diminution de 10 % de la production lactate et une diminution de la concentration en ADP, ATP.



Par rapport aux cellules jeunes à mi-confluence, les cellules vieilles à mi-confluence ont une augmentation de 70 % de la consommation en glucose et une augmentation de 50 % de la production de lactate.

Par rapport aux cellules jeunes à confluence, les cellules vieilles à confluence connaissent une augmentation de 127 % de la consommation en glucose et une augmentation de 140 % de la production de lactate.

Cela montre clairement la différence entre les cellules vieilles et jeunes; à la mi-confluence et à la confluence.

Par manque de temps, nous n'avons pu effectuer des mesures à l'oxypolarigraphe sur les différentes possibilités afin de voir si les effets observés sur la consommation de glucose, production de lactate s'illustrent au niveau de la consommation d'oxygène.

#### 3.4.7. Effet d'un agent découplant sur la chaîne respiratoire (cf. 4.2.

##### Matériels et méthodes).

L'agent découplant utilisé est le m-CCCP (Carbonyl Cyanide-m-Chlorophénylhydrazone) à la concentration finale de 50  $\mu$ M. Cette concentration est largement supérieure à celle utilisée sur les mitochondries isolées mais il faut savoir que nous travaillons sur des cellules entières, ce qui limite l'accessibilité du m-CCCP aux membranes mitochondriales. Cette concentration a déjà été utilisée précédemment dans ces conditions (Toussaint et al., 1994).

La plupart des découplants chimiques agissent en tant qu'acides faibles en dissipant le gradient de protons nécessaire au couplage entre la chaîne de transporteurs d'électrons et les phosphorylations oxydatives, ce qui affecte la synthèse d'ATP sans nuire à la chaîne respiratoire ni à l'ATP synthase. Lorsque la phosphorylation oxydative est découplée de la respiration, les réactions d'oxydation de la chaîne respiratoire se poursuivent à leur vitesse maximale, transformant l'énergie en chaleur plutôt qu'en ATP.

Lorsque nous avons mis les cellules en contact avec le m-CCCP, nous avons observé immédiatement une augmentation brutale de la consommation d'oxygène (annexe 2), ce qui indique une possibilité de transport d'électrons dans les membranes mitochondriales internes et un couplage, en conditions normales sans m-CCCP, entre ce transport d'électrons et les phosphorylations oxydatives.

Ce travail de mise au point vaut donc la peine d'être poursuivi.

## V. Conclusion et perspectives.

Dans l'introduction de ce mémoire, nous avons présenté un modèle théorique décrivant que la cellule peut être considérée comme un système ouvert loin de l'équilibre et les implications de ce modèle pour le vieillissement cellulaire. Les cellules vivent à un niveau de production d'entropie correspondant à un niveau d'activité métabolique qui peut être destabilisé lors de certaines perturbations. A partir de ce moment, soit la cellule retrouve un nouvel état stationnaire caractérisé par un niveau de production d'entropie inférieur, soit le seuil d'accumulation d'erreurs se voit dépassé et la cellule va mourir.

Principalement deux prédictions ressortent de ce modèle. Premièrement, les stress seraient capables d'accélérer le vieillissement. Deuxièmement, le niveau du métabolisme énergétique détermine la résistance des cellules aux stress d'une part en freinant leur vieillissement accéléré et d'autre part en les protégeant contre des stress léthaux. Le métabolisme énergétique épaulerait donc ainsi les systèmes de défense spécifiques d'un stress, comme par exemple, le système antioxydant constituant une réponse spécifique aux stress oxydatifs. Dans notre travail, nous nous sommes tout d'abord consacré à comparer le rôle protecteur d'un des principaux substrats du métabolisme énergétique, le D - glucose, sur la survie des fibroblastes en culture confrontés à un stress sous éthanol ou à un stress oxydatif sous tert - butylhydroperoxyde (TBHP). Et nous avons comparé les résultats obtenus à ceux obtenus d'une part en fournissant un antioxydant aux cellules : soit la vitamine E, soit la N - acétylcystéine, et d'autre part, une molécule agissant sur le relargage mitochondrial de  $Ca^{++}$  : la cyclosporine.

Dans le cas des stress sous TBHP, nous avons trouvé, dans les conditions expérimentales testées, par ordre décroissant, surtout un effet protecteur des antioxydants, qui réduisent directement les concentrations en dérivés actifs de l'oxygène. Ensuite, nous trouvons un effet protecteur de la cyclosporine A, qui a pour effet de freiner le relargage du calcium mitochondrial. Enfin, un effet protecteur du D - glucose a été trouvé. Le D - glucose joue en fournissant de l'énergie aux cellules.

1. L'augmentation du potentiel réducteur des cellules, qui représente une protection spécifique des cellules face aux stress oxydatifs, a donc donné la meilleure protection.
2. L'effet protecteur de la cyclosporine est très intéressant et corrobore les résultats obtenus par d'autres équipes. Par exemple, **Nieminen et al.** ont présenté des résultats allant dans ce sens lors du Congrès Européen de Bioénergétique (EBEC) en 1996 : la



cyclosporine A protège bien des hépatocytes en culture soumis à des stress sous TBHP 100  $\mu$ M en bloquant le relargage brutal de  $\text{Ca}^{++}$  par les mitochondries qui a lieu après un certain temps (Nieminen et al., 1996).

Nos études sur le métabolisme calcique mitochondrial pourraient être complétées de la façon suivante. Nous pourrions suivre le niveau de calcium intra-mitochondrial en utilisant une sonde (Rhod - 2) en microscopie confocale. Nous pourrions voir si le relargage de calcium s'accompagne d'une dépolarisation de la membrane mitochondriale interne en observant la perte de tetraméthyrhodamine ester, ou rhodamine 123. Enfin, nous pourrions utiliser un chélateur intracytoplasmique du calcium, comme le BAPTA et tester l'effet du Rouge Ruthénium, qui inhibe l'uniport calcique mitochondrial.

Des effets protecteurs de la cyclosporine A ont aussi été observés lors de phénomènes d'ischémie - reperfusion chez des hépatocytes et des myocytes cardiaques, de l'exposition d'hépatocytes à des ionophores du calcium (Lemasters J.J., 1996) et lors de l'exposition de cellules neuronales à du N - méthyl - D - aspartate (NMDA), qui est un agoniste des récepteurs au glutamate, et qui entraîne, par cet effet agoniste, une entrée importante de  $\text{Ca}^{++}$  dans le cytoplasme puis dans les mitochondries, ainsi que Nieminen l'a observé en microscopie confocale (Nieminen, 1996).

L'effet protecteur du D - glucose était assez timide, dans nos conditions expérimentales. Nous pourrions remplacer le D - glucose par, par exemple de la glutamine qui produit après 2 réactions enzymatiques classiques, d'abord le glutamate puis un intermédiaire du cycle de Krebs, l' $\alpha$  - cétooglutarate, directement utilisable par la cellule. Un moyen d'augmenter cet effet protecteur serait de combiner le D - glucose à une molécule qui augmente les possibilités du métabolisme énergétique, comme par exemple le bilobalide, qui agit d'une manière encore inconnue sur les membranes mitochondriales internes. Enfin, nous pourrions envisager l'utilisation conjointe de D - glucose + bilobalide et de cyclosporine A de manière à savoir si ces molécules auraient un effet additif voire même synergique. Retrouverions-nous un effet semblable ou supérieur à celui des antioxydants? D'autres auteurs ont utilisé, en plus de la cyclosporine A, un inhibiteur de la phospholipase  $\text{A}_2$ , la trifluoperazine, diminuant l'entrée de  $\text{Ca}^{++}$  dans le cytoplasme, et du desférol, une molécule qui bloque la réaction de Fenton qui produit des radicaux libres (Nieminen, 1996).

En ce qui concerne les stress sous éthanol, nous avons observé une protection importante du D - glucose sur la mortalité cellulaire. Ici aussi, des expériences complémentaires, par exemple en ajoutant de la glutamine ou du bilobalide, sont



envisageables. La cyclosporine A avait un rôle protecteur très important, nous suggérant d'autant plus de tester les différentes conditions modulant le métabolisme calcique mitochondrial et cytoplasmique, citées ci-dessus, et de suivre ces métabolismes en microscopie confocale. De plus, la figure 25 montre que la cyclosporine A offre une protection maximale lorsque la survie cellulaire est voisine de 40%, que cela soit après des stress sous TBHP ou sous éthanol, indiquant que ce mode de protection des cellules est indifférent du type de stress mais correspond probablement à un certain équilibre d'une part entre la nécessité de relargage lent du  $\text{Ca}^{++}$  hors des mitochondries et d'autre part, la nécessité pour les mitochondries de se débarrasser d'un excès de  $\text{Ca}^{++}$  qui inhibe les phosphorylations oxydatives.

Nous avons trouvé une assez faible protection par la vitamine E, en comparaison des effets obtenus avec le D - glucose et la cyclosporine A. Précédemment, nous avons discuté des hypothèses quant au faible effet protecteur de la vitamine E.

Quoi qu'il en soit, nous observons une protection importante des antioxydants et faible du D - glucose dans le cas de stress oxydatifs, et une protection importante du D - glucose dans le cas des stress sous éthanol où les antioxydants n'avaient qu'un rôle protecteur marginal.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons testé l'effet d'un antioxydant (la vitamine E) et du D - glucose sur le passage accéléré des fibroblastes humains par leurs différents morphotypes provoqués par des stress sous éthanol ou sous TBHP. Nous avons retrouvé un effet protecteur du D - glucose, qui diminuait le passage des fibroblastes vers des morphotypes plus âgés, que ce soit après les stress sous TBHP ou sous éthanol. La vitamine E a bien protégé les fibroblastes contre un vieillissement accéléré provoqué par le TBHP, confirmant ainsi le rôle des radicaux libres dans ce processus. La vitamine E n'a pas protégé les fibroblastes soumis à l'éthanol contre leur passage accéléré à des morphotypes plus âgés.

Nos résultats nous permettent donc d'avancer que les cellules ont bien été protégées, soit par un substrat du métabolisme énergétique, le D - glucose, quelque soit le type de stress, soit par un système de protection spécifique du type de stress encouru : un antioxydant contre le TBHP. Aucune protection n'est donnée par les antioxydants contre les stress sous éthanol.

Concernant les pourcentages de cellules colorées au X-gal donc présentant une activité  $\beta$  - galactosidase associée au vieillissement, alors que le D - glucose et la vitamine E diminuent l'augmentation du pourcentage de cellules colorées provoquée par le stress

sous TBHP, seul le D - glucose protège et diminue cette augmentation de pourcentage de cellules colorées lors de stress sous éthanol.

Nous retrouvons aussi des résultats de même ordre (D- glucose et vitamine E protègent contre TBHP, D - glucose et non la vitamine E protège contre l'éthanol) lorsque nous comparons les pourcentages de cellules colorées obtenus pour chaque morphotype en considérant chaque morphotype respectif comme 100 %.

Nous pourrions bien sûr ici aussi déterminer les protections obtenues par la glutamine, avec ou sans D - glucose, ou par le D - glucose + bilobalide, en ce qui concerne le métabolisme énergétique. Observerait-on un effet additif en présence d'antioxydant ? Les effets d'antioxydants masqueraient-ils les effets sur le métabolisme énergétique ? Quel serait ici le rôle protecteur de la cyclosporine A, comparé par exemple à celui d'un inhibiteur de l'uniport calcique mitochondrial. Ces résultats nous permettraient peut-être de distinguer 2 phénomènes. D'une part, on pourrait avoir un rôle inhibiteur de la cyclosporine A sur le relargage massif de  $Ca^{++}$  mitochondrial par formation de pores transitoires, lors de stress très cytotoxiques. D'autre part, on pourrait observer un effet inhibiteur de la cyclosporine A sur le relargage plus lent de  $Ca^{++}$ , sans formation de pores transitoires, et sans dépolarisation des membranes mitochondriales internes, dans le cas de stress de plus faible intensité ayant surtout un effet sur le passage des fibroblastes à des morphotypes plus âgés et non sur la mort cellulaire. Peut-être concilierions-nous ainsi les hypothèses des groupes de Bernardi et de Richter, dont nous avons parlé dans l'introduction.

Nous voudrions aussi mesurer le niveau d'ATP dans les cellules, dans les différentes conditions de stress testées. La cyclosporine A permettrait-elle de conserver un niveau d'ATP élevé ? Ou alors, la cellule peut-elle se passer momentanément d'une quantité élevée d'ATP (le  $Ca^{++}$  mitochondrial élevé diminuant la synthèse d'ATP) pour autant qu'il n'y ait pas de relargage brutal de  $Ca^{++}$  dans le cytoplasme ?

Quel serait la protection offerte par la cyclosporine A en conjonction avec le D - glucose et le bilobalide ?

Une autre prédiction de notre modèle théorique était que l'intensité du métabolisme respiratoire mitochondrial chuterait au cours du vieillissement. Nous avons donc commencé à mettre au point un protocole de mesure de la consommation d'oxygène par des cellules dont la membrane plasmique est perméabilisée.

Dans le but d'améliorer les résultats obtenus, nous pourrions tout d'abord mesurer la quantité de cholestérol présent dans les membranes des cellules jeunes et vieilles afin

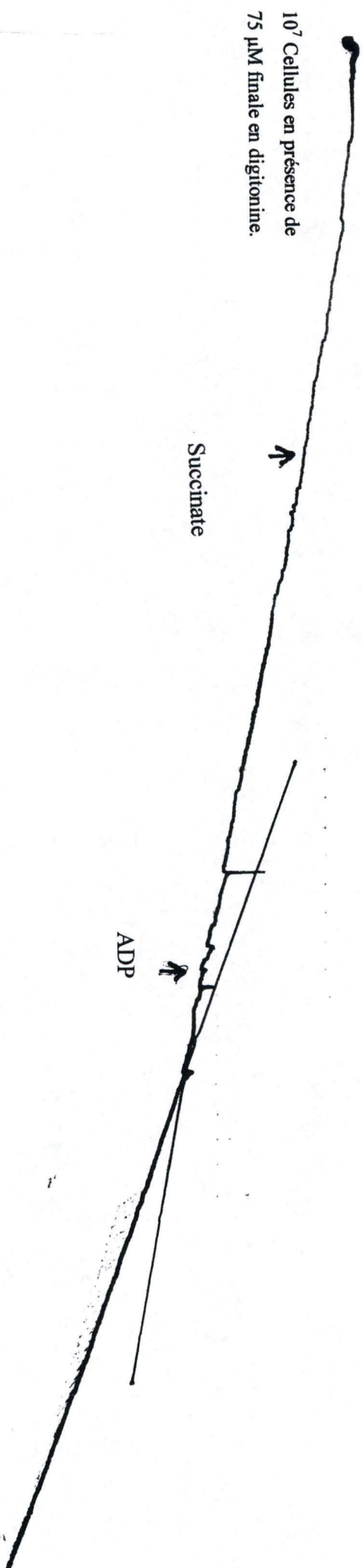


d'optimiser la concentration en digitonine. Ensuite, il serait intéressant de mesurer la respiration en présence de molécules telles que les ions vanadate (inhibiteurs des pompes calciques), l'iodoacétate (inhibiteur de la glycolyse), fournir aux cellules d'autres substrats énergétiques (pyruvate et malate en combinaison, glutamate - malate, glutamine,...) afin de comparer les consommations d'oxygène par les cellules.

Une fois ces expériences mises au point, nous pourrions comparer les quantités d'oxygène consommée par unité de temps, les RC, UCR des cellules jeunes, vieilles et même de cellules ayant subi des stress successifs.

Nous pourrions aussi établir une hiérarchie de voies métaboliques principales comme la synthèse de protéines,  $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPase}$ ,  $\text{Ca}^{++} - \text{ATPase}$ , synthèse d'ARN et d'ADN dans ces diverses populations cellulaires pour savoir si les cellules vieilles ou ayant subi des stress successifs, réorientent leurs propriétés de défense énergétique. Ces études se font à l'aide d'inhibiteurs appropriés à chacune de ces voies, que l'on fournit aux cellules avant de mesurer leur consommation d'oxygène, qui diminue d'autant qu'une voie métabolique est plus ou moins grande consommatrice d'ATP.



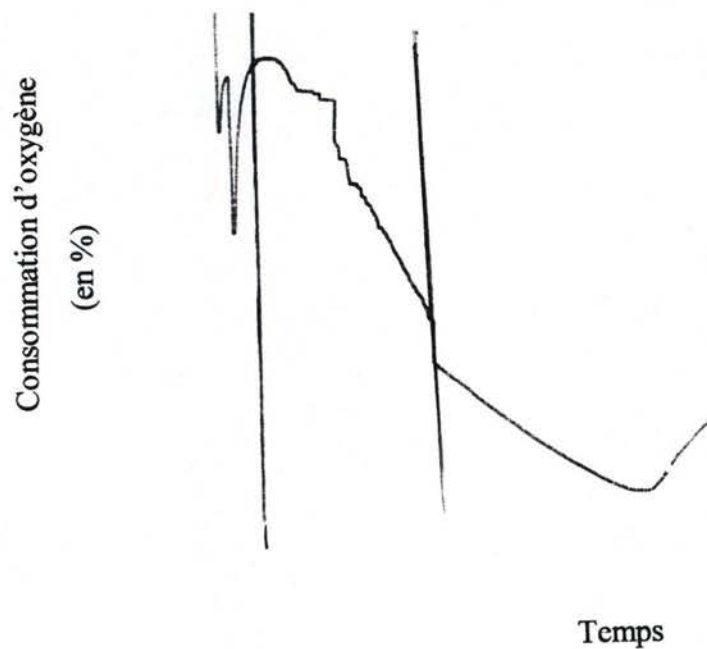


RC = 1,8

Consommation d'oxygène  
(en %)

Annexe 1. Essais de respiration sur des fibroblastes de génération 37,  
une concentration de 75 µM finale en digitonine fut utilisée.  
Un index respiratoire RC (« Respiratory Control ») a pu être  
calculé et équivalent au rapport entre la vitesse en présence d'ADP  
et la vitesse en présence de succinate.

Temps



Annexe 2. Action d'un agent découplant sur la consommation d'oxygène.

Les fibroblastes sont incubées en présence de m - CCCP à la concentration de 50  $\mu$ M.

On remarque une augmentation rapide de la consommation d'oxygène du milieu.

## VI. Bibliographie.

ADICKES E.A., MOLLNER T.J., LOCKWOOD S.K. :

*Ethanol induced morphologie alterations during growth and maturation of cardiac myocytes.* Alcoholism Clin. Exp. Res. **14**, 1990, 827 - 831.

ALLSOPP R.C., VAZIRI H., PATTERSON C., GOLDSTEIN S., YOUNGLAI E.V.,  
FUTCHER A.B., GREIDER C.W., HARLEY C.B. :

*Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts.* Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A., **89**, 1992, 10 114 - 10 118.

BABLOYANTZ Z. :

*Molecules, dynamics and life ;* in PRIGOGINE I., NICOLIS G. (eds) : *Nonequilibrium problems in the physical science an biology : an introduction to self organisation of matter ;* vol. **4**, Wiley Interscience, New York, 1986.

BARNES Y., HOUSER S., BASILE F.A. :

*Temporal effects of ethanol on growth, thymidine uptake, protein and collagen production in human foetal lung fibroblats.* Toxicol. in vitro **4**, 1990, 1 - 7.

BASAGA H. :

*Biochimical aspects of free radicals.* Biochem. Cell. Biol. **68**, 1989, 989 - 998.

BAYREUTHER K., RODEMAN H.P., HOMMEL R., DITTMANN K., ALBIEZ M.,  
FRANCZ P.P. :

*Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **85**, 1988, 5112 - 5116.

BAYREUTHER K., RODEMAN H.P., FRANCZ P.I., MAIER K. :

*Differentiation of fibroblasts stem cells.* J. Cell. Sci. Suppl. **10**, 1989, 1 - 15.



BERNARDY P. :

*The permeability transition pore . Control points of a cyclosporin A - sensitive mitochondrial, channel involved in cell death.* Biochim. Biophys. Acta. **1275**, Elsevier, 1996, 5 - 9.

BORTZ W.M. :

*Aging as entropy.* Exp. gerontol. **21**, 1986, 321 - 328.

BRAZEAU G.A., FUNG H. L. :

*Mechanisms of creatin kinase release from isolated rat skeletal muscles damaged by propylen glycol and ethanol.* J. Pharmaceut. Sci. **79**, 1990, 393 - 397.

BUTTGEREIT F., BRAND M.:

*Hierarchy of ATP - consuming processes in mammalian cell.* Biochem.,**312**, 1995, 163 - 167.

BYRNE E., DENNET X., TROUNCE J. :

*Oxidative emergy failure in post-mitatic celles : a major factor in senesce,ce.* Rev. Neurol. **147**, Paris, 1991, 532 - 535.

CAMPISI J., DIMRI G., HARA E. :

*Control of Replicative Senescence. Handbook of the Biology of Aging.* 4<sup>th</sup> ed., Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1996, 121 - 140.

CHEN Q., AMES B.N. :

*OXIDATIVE DNA damage and senescence of human diploid fibroblasts cells.*  
Proceding of the National Academy of Sciences, U.S.A., 1994.

COUNTER C.M., AVILLON A.A., LEFEUVRE C.E., STEWART N.G., GREIDER C.W., HARLEY C.B., BACCHETI S. :

*Telomerase shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal celle which express telomerase activity.* EMBO Journal, **11**, 1921 - 1929.

COUNTER C.M., HIRTE H.W., BACCHETTI S., HARLEY C.B. :

*Telomerase activity in human ovarian carcinoma.* Proceedings of the national Academy of Sciences of U.S.A., **91**, 2900 - 2904.

CRASTES de PAULET A. :

*Radicaux libres et vieillissement.* Ann. Biol. Clin. **48**, 1990, 323 -330.

CUTLER R.G. (ed) :

*The dysdifferentiative hypothesis of mammalian aging and longevity;* in GIACOBINI E., FILOGAMO G., VERNADAKIS A. (eds) :*The aging brain. Cellular and molecular mechanisms of aging in the nervous system.* Raven Press, New York, 1982, 1 - 19.

CUTLER R.G. :

*Recent progress in testing the longevity determinant and dysdifferentiation hypotheses of aging.* Arch. Gerontol. Geriatr. **12**, 1991, 75 - 98.

DIMRI G.P., LEE X., BASILE G., ACOSTA M., SCOTT G., ROSKELLEY C.,  
MEDRANO E.E., LINSKENS M., RUBEL J.I., PEREIRA - SMITH O.,  
PEACOCKE M., CAMPISI J. :

*A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo.*  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol **92**, 9363 - 9368.

FANTONE J.C., WARD P.A. :

*Role of oxygen - derived free radical and metabolites in leucocytes - dependant inflammatory reactions.* Am. J. Pathol. **107**, 1982, 397 - 418.

FLOHE L., GUNZLER W.A. :

*Assays of glutathione peroxidase.* Methods Enzymol. **105**, 1984, 114.

GLANDSDORFF P., PRIGONINE I. (eds) :

*Thermodynamics of structure, stability and fluctuations.* Wiley Interscience, New York, 1971.

GOLDSTEIN S., MOERMAN E. :

*Heat - labile enzymes in skin fibroblasts from subjects with progeria.* New England J. Med. **292**, 1975, 159 - 163, 1305 - 1309.

GOLDSTEIN S., BALLANTYNE S.R., ROBSON A.L., MOERMAN E.J. :

*Energy Metabolism in Cultured Human Fibroblasts During Aging In Vitro.* J. Cell. Physiol. **112**, 1982, 419 - 424.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C. :

*Free radicals in biology and medicine.* Oxford University Press, 1983, 1 - 583.

HANSEN M.B., NIELSEN S.E., BERG K. :

*Re - examination and further development of a precise and rapide dye methode for measuring cell growth/ cell kill.* J. Immunol. Methods **119**.

HARDWICK J., HEISCH W.H., LIU D.S., RICHARDSON A. :

*Cell - free proteins synthesis by kidney from the aging female. Fisher F 344 rat.* Biochemie **652**, 1981, 204 - 217.

HARLEY C.B., FUTCHER A.B., GREIDER C.W. :

*Telomeres shorter during ageing of human fibroblasts.* Nature **345**, 1990, 458 - 460.

HARMAN D. :

*Aging a theorie based on free radical and radiation chemistry.* J. Gerontol. **11**, 1956, 290 - 298.

HARMAN D. :

*Prologation of life : role of free radical reactions in aging.* J. Amer. Geriatrics Soc. **17**, 1969, 721 - 731.



HARMAN D. :

*Free radical theory of aging : origin of life, evolution and aging.* Age **3**, 1980, 100 - 102.

HARMAN D.

in WARNER M., BUTLER R., SPROTT R.L., SCHNEIDER E. (eds) : *Aging*, vol **31**, Raven Press, New York, 1987, 81 - 92.

HAYFLICK L., MOORHEAD P.S. :

*The serial cultivation of human diploid cell strains.* Exp. Cell. Res. **25**, 1961, 585 - 621.

HAYFLICK L. :

*The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains.* Exp. Cell. Res. **31**, 1965, 614 - 636.

HAYFLICK L. :

*The cellular basis for biological aging;* in HAYFLICK L., FINCH C.E. (eds) : *Handbook of biological aging.* Van Nostrand Reinhold co. New York, 1977, 156 - 159.

KANUNGO M. S. (ed) :

*Biochemistry of aging.* Academic Press, New York, 1980.

KIRKWOOD T.B.L., CREMER T. :

*Cytogerontology since 1981: a reappraisal of August Weismann and a review of modern progress.* Human Genetics **60**, 1982, 101 - 121.

LEIBOVITZ B.E., SIEGEL M.S. :

*Aspects of free radicals reactions in biological systems : aging.* J. Gerontol. **35**, 1980, 45 - 46.

LEMASTERS J.J. :

*Mitochondria as a target of toxic, hypoxic and reperfusion injury.* Biochim. Biophys. Acta, EBEC Reports, **9**, 1996, 123.

LEVY M.Z., ALLSOPP R.C., FUTCHER A.B., GREIDER C.W., HARLEY C.B. :  
*Telomere end - replication problem and cell aging*. Journal of Molecular Biology **225**,  
1992, 951 - 960.

LOWRY D.H., ROSEBROUGH N.I., FARR A.L., RANDALL R.J. :  
*Protein measurement with Folin phenol reagent*. J. Biol. Chem. **193**, 1951, 265 - 275.

MICHIELS C., TOUSSAINT O., REMACLE J. :  
*Comparative study of oxygen toxicity in human fibroblasts and endothelial cells*. J. Cell.  
Physiol. **144**, 1990, 295 - 302.

MICHIELS C., RAES M., HOUBION A., REMACLE J. :  
*Association of antioxidant systems in the protection of human fibroblasts against  
oxygen derived free radicals*. Free Radic - Res. Comm. **14**, 1991, 323 - 334.

MOLENAAR T., HULSTAERT C.E., HARDONK M.J. :  
*Role in function and ultrastructure of cellular membranes; in vitamin E, A  
comprehensive treatise*. MACHLIN, DEKKER (eds), Inc, New York, 1980, 373 - 389.

MOSMANN T. :  
*Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation  
and cytotoxicity assays*. J. Immunol. Meth. **65**, 55 - 63.

NAGORNY A.V., NIKITIN V.N., BULANKIN I.N. :  
*Problems of aging and longevity*. State Publ. House Med. Lit. Moscow, Russian, 1963.

NIEMINEN A.L. :  
*Confocal microscopic studies of the mitochondrial permeability transition in intact  
cells*. Biochim. Biophys. Acta., **9**, 1996, 124.

NIEMINEN A.L., BYRNE A.M., LEMASTER J.J. :  
*Contribution of increased mitochondrial calcium to tert - butylhydroperoxide induced  
hepatocyte death*. Biochim. Biophys. Acta. EBEC Reports, **9**, 1996, 124.

NIWA Y., KASAMA T., KAWAI S., KOMURA J., SAKANO T., KANO T.,  
MIYACHI Y. :

*The effect of aging on cutaneous lipid peroxide levels and superoxide dismutase activity in guinea pigs and patient with burns.* Life Sci. **42**, 1987, 351 - 356.

OUNISHI S.T., FLICK J.L., RUBIN E. :

*Ethanol increases calcium permeability of heavy sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle.* Archives of Biochemistry and Biophysics **293**, 1984, 588 - 594.

ORGEL L.E. :

*The maintenance of accuracy of protein synthesis and its relevance to aging.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol **67**, 1963, 517 - 521.

ORGEL L.E. :

*Aging of clones of mammalian cells - Nature* (London) **243**, 1973, 441 - 445.

PARKS D.R., BRUJAN V.M., OI V.T., HERZBERG L.A. :

*Antigen specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescent activated sorter (FACS).* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **76**, 1979, 1962 - 1966.

PASTERNAK C.A., AIYATHURAI J.E., MAKINDE V., DAVIES A.,  
BALDWIN S.A., KONIECZKO E.M., WIDNELL C.C. :

*Regulation of glucose uptake by stressed cells.* J. Cell. Physiol. **149**, 1991, 324 - 331.

POOT M. :

*Oxidant and antioxidant in proliferative senescence.* Mut. Res. **256**, 1991, 177 - 190.

PRIGOGINE I. :

*Etude thermodynamique des processus irréversibles.* Desoer, Liège, 1947.



REMACLE J., LAMBERT D., RAES M., PIGEOLET E., MICHIELS C.,  
TOUSSAINT O. :

*Importance of the various antioxidant enzymes for the stability of the cells. Confrontation between theoretical and experimental results. Bioch. J.* **286**, 1992, 41 - 46.

RICHTER C. :

*Control of the pro - oxidant dependant, calcium release from intact liver mitochondria. Redox Report* **2** (4) , Pearson Prof. Ltd., Suisse , 1996, 217 - 221.

RODEMANN H.P. :

*Differential degradation of intercellular proteins in human skin fibroblasts of mitotic and mytomycin - C (MMC) - induced postmitotic differentiation states in vitro. Differentiation* **42**, 1989, 37 - 43.

ROSETTE C., HARIM M. :

*Ultraviolet light and osmotic stress activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. Science* **274**, 1996, 1194 - 1197.

SIBERMEN S., Mc GARVEY T.W., COMRIE E., BRUCE P. :

*The influence of ethanol on cell membrane fluidity, migration and invasion of murine melanoma cells. Experimental Cell. Research* **189**, 1990, 64 - 68.

SLAGBOOM P.E., VIJG J. :

*Genetic instability and aging : theories, facts and future perspectives. Genome* **31**, 1989, 373 - 385.

SOHAL R. S. :

*Superoxide anion production in different animal species. Mech. Ageing Dev.* **49**, 1989, 129 - 135.

STRIBLER H., BEAUGE F., LEGUICHER A., BORG S. :

*Biophysical and biochemical alterations in erythrocyte membranes from chronic alcoholics. Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **51**, 1991, 309 - 319.

STREHLER B.L. :

*Time, cells and aging.* Academic Press, New York, 1978.

STREHLER B. L. :

*Genetic instability as the primary cause of human aging.* Experimental Gerontology **21**, 1986, 283 - 319.

TOUSSAINT O., RAES M., REMACLE J. :

*Aging as a multi - step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stage.* Mech. Ageing Dev. **64**, 1991, 45 - 46.

TOUSSAINT O., HOUBION A., REMACLE J. :

*Aging as a multi - step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stage. // .Experimental results with cultivated cells.* Mech. Ageing Dev. **65**, 1992, 65 - 83.

TOUSSAINT O., HOUBION A., REMACLE J. :

*Relationship between the critical level of oxidative stresses and the glutathione peroxidase activity.* Toxicology **81**, 1993, 89 - 101.

TOUSSAINT O., DUMONT P., REMACLE J. :

*Effects of successive stimulations with TNF -  $\alpha$  and il 1 on the in vitro ageing of WI - 38 fibroblasts.* Biochem. Soc. Trans **24**, 1996, 535.

TOUSSAINT O., HOUBION A., REMACLE J. :

*Effects of modulations of the energetic metabolism of the mortality of cultured cells.* Biochim. Biophys. Acta **1186**, Elsevier, 1994, 209 - 220.

YAMAUCHI M., WOODLEY D.T., MECHANIC G.L. :

*Aging and cross - linking of skin collagen.* Biochem. Biophys. Res. Comm. **152**, 1988, 898 - 903.

YUAN C., PENTTILA K.E., ALFTHAN G., LINDROS K.O. :

*Role of selenium-dependant glutathione peroxidase in protecting against t - butyl hydroperoxide - induced damage in hepatocytes.* Pharmacol. Toxicology **98**, 1991, 196 - 200.





X

BUMP



007162050

\*FM B04/1997/01

